

**Министерство здравоохранения Республики Беларусь
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Кафедра нормальной физиологии

С.С. ЛАЗУКО

Механизмы регуляции тонуса сосудов сердца: роль iNOS и калиевых каналов

Монография

*Витебск
ВГМУ
2019*

УДК 612.17:576.314
ББК 54.10-2
Л17

Рекомендовано к печати Научно-техническим Советом УО «ВГМУ» (протокол № 10 от 02.03.2019 г.)

Рецензенты: док.мед.наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь В.П. Подпалов (Заведующий кафедрой терапии № 1 ФПК и ПК. УО «ВГМУ», г. Витебск); докт. биол.наук, доцент В.И. Козловский (Заведующий кафедрой Фармакологии имени профессора М.В. Кораблёва УО «ГрГМУ», г. Гродно)

Лазуко, С.С.

Л17 Механизмы регуляции тонуса сосудов сердца: роль iNOS и калиевых каналов : монография / С. С. Лазуко. – Витебск: ВГМУ, 2019. – 216 с.

ISBN 978-985-466-956-4

Монография посвящена изучению локальных механизмов регуляции сосудистого тонуса. Сделан акцент на изучении влияния калиевых каналов на iNOS-зависимые механизмы ограничения постстрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда.

В монографии рассмотрены механизмы активации индуцибельной NO-синтазы. Впервые проведен сравнительный анализ роли NO в регуляции функций сосудов сердца при адаптации к коротким стрессорным воздействиям, с другими формами патологии, сопровождающимися гиперпродукцией NO – иммобилизационном стрессе и экспериментальном сахарном диабете.

В монографии обобщены данные литературы, а также представлены результаты собственных исследований, впервые демонстрирующие влияние длительного стресса и экспериментального сахарного диабета на развитие «каналопатии», а также возможности ее коррекции.

Описаны новые способы фармакологической коррекции нарушений функциональной активности калиевых каналов коронарных сосудов. Впервые описано модулирующее влияние производных бензимидазола на функциональную активность К_{АТФ}- и ВК_{Са} калиевых каналов. Сделана попытка описания механизмов, лежащих в основе кардиопротекторного эффекта активаторов калиевых каналов.

Книга предназначена для физиологов, патофизиологов, биохимиков, врачей кардиологов, а также студентов и аспирантов медицинских и биологических специальностей.

УДК 612.17:576.314
ББК 54.10-2

ISBN 978-985-466-956-4

© С.С. Лазуко, 2019
© УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский
университет», 2019

Оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ сокращений, условных обозначений.....	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОСОБЕННОСТИ КОРОНАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ.....	9
1.1. Базальный сосудистый тонус	9
1.2. Взаимоотношение «давление - кровоток» (ауторегуляция кровотока) в коронарной сосудистой системе	10
ЛИТЕРАТУРА	20
ГЛАВА 2 МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ.....	26
2.1. Множественность факторов эндотелийзависимой регуляции тонуса сосудов	26
2.2. Механизмы регуляции монооксида азота	36
2.3. Основные функции NO в сердечно-сосудистой системе.....	37
ЛИТЕРАТУРА	41
ГЛАВА 3 КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ И РЕГУЛЯЦИЯ СОСУДИСТОГО ТОНУСА	51
3.1. Классификация, функции калиевых каналов и их локализация в клетках различных органов	51
3.2. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов в регуляции тонуса сосудов сердца	52
3.3. Роль ВК _{Ca} -каналов в регуляции тонуса сосудов сердца	56
ЛИТЕРАТУРА	63
ГЛАВА 4 iNOS-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА СОСУДОВ СЕРДЦА	71
4.1. Роль индуцибельной NO-синтазы в регуляции тонуса сосудов сердца при экспериментальном сахарном диабете, иммобилизационном стрессе и адаптации к коротким стрессорным воздействиям	72
4.1.1. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс, перенесших иммобилизационный стресс	74
4.1.2. Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс, перенесших иммобилизационный стресс.....	76
4.1.3. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом.....	77
4.1.4 Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом	79
4.1.5. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс, адаптированных к стрессу.	78
4.1.6. Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс, адаптированных к стрессу	83
4.2 Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, адаптации к стрессу на экспрессию eNOS и iNOS в сегменте аорты	84
4.3. Роль индуцибельной NO-синтазы в регуляции тонуса коронарных сосудов при иммобилизационном стрессе, экспериментальном сахарном диабете и адаптации к коротким стрессорным воздействиям	86
4.3.1. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, их сочетания, а также адаптации к коротким стрессорным воздействиям на изменение системного артериального давления у крыс	98
4.3.2. Анализ изоферментного спектра NOS в миокарде крыс при иммобилизационном стрессе, экспериментальном сахарном диабете, их сочетании, а также адаптации к коротким стрессорным воздействиям.....	101
4.3.3. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета и адаптации к стрессу на показатели концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка, NO ²⁻ /NO ³⁻ , продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность	103

4.3.4. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, адаптации к стрессу на экспрессию eNOS и iNOS в препаратах левого желудочка.....	106
4.4. Влияние системной блокады iNOS на тонус коронарных сосудов крыс при адаптации к стрессу.....	111
ЛИТЕРАТУРА	122
ГЛАВА 5 NO-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КАТФ- И ВКСa-КАНАЛОВ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ.....	126
5.1. Влияние блокады NO-синтазы L-NAME на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших иммобилизационный стресс, экспериментальный сахарный диабет и их сочетание.....	128
5.2. Влияние блокады индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевинной на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших иммобилизационный стресс, на фоне экспериментального сахарного диабета	134
5.3. Влияние интракоронарного введения блокатора NO-синтазы (L-NAME) и ВКСa-каналов на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших стресс на фоне сахарного диабета	138
5.4. Влияние интракоронарного введения блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевинной и ВКСa-каналов тетраэтиламмония на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших стресс на фоне экспериментального сахарного диабета.....	142
5.5. Вклад конституциональной и индуцибельной NO-синтаз в развитие нарушения функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при стрессе, сахарном диабете и их сочетании.....	145
5.6. Роль iNOS в регуляции функциональной активности ВКСa- и КАТФ-калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, при экспериментальном сахарном диабете	150
5.7. Роль iNOS в регуляции функциональной активности ВКСa- и КАТФ-калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу	156
ЛИТЕРАТУРА	165
ГЛАВА 6 ВЕЩЕСТВА МОДУЛИРУЮЩИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КАТФ- И ВКСa-КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ	168
6.1. Влияние монооксида азота на вазодилаторный эффект дибазола	169
6.2. Влияние дибазола на эндотелийзависимую вазодилатацию изолированного кольца аорты в условиях блокады системы синтеза монооксида азота.....	172
6.3. Влияние дибазола на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов в условиях блокады системы синтеза монооксида азота.....	174
6.4. Влияние дибазола на функциональную активность ВКСa-каналов в условиях блокады системы синтеза монооксида азота	179
6.5. Влияние 2-этилтиобензимидазола гидробромида на выраженность дилатации сегмента аорты	183
6.6. Влияние NS-1619 на выраженность дилатации сегмента аорты.....	185
6.7. Возможность профилактики стрессорных изменений коронарного кровообращения и сократительной функции миокарда зависит от состояния функциональной активности КАТФ-каналов.....	187
6.7.1. Предварительное введение пинацидила предупреждает постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов.....	199
6.7.2. Предварительное введение 2-бензимидазола гидробромида предупреждает постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов	205
ЛИТЕРАТУРА	210
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	213

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД – артериальное давление
ВК_{Ca} – кальцием активируемые калиевые каналы
ДАД – диастолическое артериальное давление
ИА – индекс ауторегуляции
ИЛ – интерлейкины
КРР – коронарный расширительный резерв
КАТ – каталаза
К_{АТФ} – АТФ-чувствительные калиевые каналы
КПД – коронарное перфузионное давление
МГКП – максимальный гиперемический поток
ОСКП – объемная скорость коронарного потока
ПД – перфузионное давление
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РВД – развиваемое внутрижелудочковое давление
СрАД – среднее артериальное давление
САД – систолическое артериальное давление
СОД – супероксиддисмутаза

*Посвящается памяти моего мужа и
учителя доктора медицинских наук,
профессора Александра Петровича
Солодкова*

Свое наследие или своя научная школа будет тебя помнить только в одном случае, если при жизни будешь еще и еще раз воспроизводить свои работы в различной форме. Тогда, когда тебя не будет, а этот стиль останется стилем творческой жизни твоих учеников, тогда они бессознательно будут воспроизводить твой стиль мышления еще и еще раз. Может кому-то придет в голову, что они работают в стиле своего учителя.

Из дневника профессора А.П. Солодкова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой сердечно-сосудистой физиологии является изучение локальных механизмов регуляции сосудистого тонуса, которые имеют важное значение в поддержании нормального уровня артериального давления как одного из важных гемодинамических показателей [7].

Сосудистый тонус обеспечивается сократительной активностью гладкомышечных клеток, находящихся в стенках сосудов, и играет важную роль в регуляции кровяного давления и распределении кровяного потока в тканях и органах. Регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток кровеносных сосудов в системном кровообращении зависит от комплексного взаимодействия вазоконстрикторных и вазодилататорных стимулов из циркулирующих в кровяном русле гормонов, нейромедиаторов, эндотелиального фактора гиперполяризации, а также кровяного давления [63]. Все эти сигналы обрабатываются сосудистыми гладкомышечными клетками, определяя активность их сократительного аппарата, а следовательно - диаметр и гидравлическое сопротивление кровеносных сосудов. Ионные каналы играют важную роль в этом процессе. Они обеспечивают создание мембранного потенциала (МП) покоя, возбудимость, деполяризацию, инициируют выделение гормонов и сокращение мышечных волокон, регулируют pH и объем клетки, обеспечивают пассивный транспорт ионов и воды через мембрану, внутриклеточную концентрацию ионов кальция.

В последнее десятилетие проявляется большой интерес к изучению роли калиевых каналов в функционировании клеток и их участию в патогенетических механизмах заболеваний [63, 85, 86]. Калиевые каналы обнаружены в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках сосудов, в нейронах, в миоцитах внутренних органов. Калиевые каналы вовлечены в управление пролиферацией клетки, апоптоз, синтеза NO [1, 109], в развитие опухолей и секрецией инсулина [13], принимают участие в транспорте электролитов в эпителии, например, в канальцах почки или в ободочной кишке млекопитающих, регулируют сокращение миомерия [72]. Достижения в изучении калиевых каналов приобретают в последнее время все большее патофизиологическое и прикладное значение. Исследования в этих направлениях позволяют объяснить патогенез, симптоматику и патофизиологические основы формирования заболеваний, связанных с нарушениями функциональной активности калиевых каналов.

Известно, что функциональная активность K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов модулируется монооксидом азота. В сердце экспрессируются все три изоформы NO-синтазы. Хорошо изучена роль эндотелиальной NO-синтазы, в то время как значение индуцибельной NO-синтазы до настоящего момента остается противоречивой.

Современные исследования показали, что наряду с отрицательными эффектами iNOS существуют и положительные. К отрицательным эффектам (связаны с высоким уровнем NO, активных форм кислорода и ONOON) относятся атерогенный, перегрузка клеток Ca^{2+} , повреждение миокарда, проапоптотический, прооксидантный (снижение активности антиоксидантных ферментов), сократительная дисфункция, увеличение проницаемости сосудов. К положительным эффектам (связаны с низким уровнем NO) можно отнести: адаптационную защиту организма, антиапоптотический, антиатерогенный, антиоксидантный, антипролиферативный, антистрессорный, вазодилатацию, врожденный иммунитет к инфекциям, вирусного, микобактериального и паразитарного происхождения, иммунитет при онкологических, заболеваниях, кардиопротекцию, противовоспалительную, цитопротекцию.

В настоящее время появилось описание возможности в различной степени вызывать экспрессию iNOS. Так при интермиттирующей гипоксии возникает небольшая активация генов ответственных за синтез iNOS с последующим депонированием NO. При действии различных стрессоров (психосоциальный стресс у человека и иммобилизационный стресс у крыс) образуются интерликины ($ФНО\alpha$, ИЛ-1 β , ИЛ-6), которые, в свою очередь, приводят к образованию iNOS. В настоящее время показано, что некоторые биологически активные вещества обладают подобной способностью. Наиболее известным из них является липополисахарид, который приводит к значительному образованию NO, образуя iNOS. Более того, введение таких веществ, как аденозин (показана связь между активацией аденозиновых рецепторов и защитным эффектом, реализующимся через NO-зависимые механизмы [107] и окситацин (предварительное введение окситоцина защищает сердце при ишемии-реперфузии путем активации АТФ-зависимых калиевых каналов. [38] сопровождается образованием iNOS, но в количестве значительно меньшем, чем при действии липополисахарида. Таким образом, эти вещества представляют интерес для дозируемого образования iNOS, когда она будет продуцировать увеличенное, но не избыточное количество NO. В монографии рассмотрены механизмы активации индуцибельной NO-синтазы. Проведен сравнительный анализ роли NO в регуляции функций сосудов и сердца, при адаптации к коротким стрессорным воздействиям, с таковыми при патологических состояниях, сопровождающиеся гиперпродукцией NO – иммобилизационном стрессе и экспериментальном сахарном диабете. Показано, что функциональное состояние миокарда во многом зависит от количества оксида азота, длительности его образования, а также от локализации и условий, в которых он будет синтезирован. Знание этапов и молекулярных механизмов регуляции iNOS позволит контролировать активность этого фермента, что представляет несомненный интерес для практической медицины и имеет важное значение в выработке целенаправленной терапевтической стратегии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

В монографии обобщены данные литературы, а также представлены результаты собственных исследований, впервые демонстрирующие влияние длительного стресса на развитие постстрессорной каналопатии и возможности ее коррекции. Сформулирована новая концепция о роли K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов в iNOS-зависимых механизмах ограничения постстрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, что может быть рассмотрено как один из механизмов кардио- и вазопротекции.

Патогенез развития постстрессорной каналопатии и iNOS-зависимые механизмы ограничения постстрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда рассматривается с позиции физиологических, биохимических,

фармакологических методов, а также экспериментальных методов исследования молекулярной биологии.

Такой подход позволит объяснить, как механизмы формирования патофизиологических признаков каналопатии, так и функциональных нарушений в органе.

Я считаю своим приятным долгом выразить глубокую признательность сотрудникам физиологической группы НИЛ ВГМУ, научному сотруднику Яроцкой Н.Н. за оказанную помощь в создании моделей стресса, адаптации и при выполнении биохимических исследований. Кандидату медицинских наук Скринаус С.С. за совместное сотрудничество при постановке физиологических экспериментов. Профессору, член-кор. РАМН Тоневицкому А.Г., сотрудникам ООО Научно-технический центр «БиоКлиникум» кандидату медицинских наук Шкурникову М.Ю., Крайновой Н.А. за активное участие в проведении экспериментов и обсуждении результатов, касающихся методов молекулярной биологии.

Изложенные в монографии результаты собственных исследований получены благодаря финансовой поддержке грантами БР ФФИ (№ Б05М-184), БР ФФИ (№ Б09-045), ГПНИ (задание 1.2.49).

ГЛАВА 1

ОСОБЕННОСТИ КОРОНАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Сердце представляет собой орган, который постоянно сокращается, поэтому для поддержания метаболизма оно нуждается в большом количестве кислорода и субстратов. В покое артериовенозная разница по кислороду в коронарном кровообращении почти максимальна, а коэффициент его утилизации равен 60–70% и практически не изменяется при возрастании потребности миокарда в кислороде, поэтому увеличение снабжения миокарда кислородом полностью зависит от величины коронарного кровотока. Кроме того, динамические изменения состояния сердца требуют наличия быстрой и точной системы регуляции величины коронарного кровотока, поддерживающей баланс между потребностью и его снабжением кислородом и питательными веществами [42, 54, 76]. Так как коронарное сосудистое сопротивление создается благодаря артериальным микрососудам [31, 93, 105], артериолам и маленьким артериям, то именно от изменения их тонуса и зависит величина коронарного кровотока в данный момент времени.

Количество крови, протекающей через коронарное сосудистое русло, зависит от нескольких факторов. Во-первых, от выраженности присущего самой сосудистой стенке миогенного (базального) тонуса, изменяющегося под влиянием скорости потока крови. Во-вторых, от интенсивности локально образующихся метаболитов, и в-третьих, от нейрорефлекторных влияний. Особый интерес представляет влияние на механическую активность миокарда давления и объемной скорости кровотока в коронарном сосудистом русле, обусловленные первичными сдвигами давления в аорте.

1.1. Базальный сосудистый тонус

Базальный сосудистый тонус представляет собой длительную специфическую активность гладкомышечных клеток стенки сосуда, обеспечивающую определенную величину их констрикции, лежащую в основе резерва регионального кровотока [56] и являющуюся мишенью для воздействия различных регуляторных факторов, способных вызвать вазодилатацию или вазоконстрикцию. Следовательно, от тонуса сосудов зависит величина сосудистого сопротивления. W. Bayliss и B. Folkow [18] считали, что базальный тонус сосудов обусловлен миогенными механизмами. В основе этого заключения лежат факты о том, что изменение сопротивления потоку зависит от внутрисосудистого давления, а также наблюдается в сосудах денервированных изолированных органов [15, 55, 73, 77, 83, 110]. Хорошо выраженной способностью развивать спонтанный миогенный тонус обладают артериальные сосуды с диаметром менее 150 мкм. Базальный тонус сосудов чрезвычайно страдает при глубоком наркозе, интенсивном хирургическом вмешательстве или травме [19, 32, 50, 113]. В изолированных препаратах артерий и артериол, находящихся под давлением, величина тонуса часто сопоставима с той, которая наблюдается в условиях *in vivo*.

Необходимо отметить, что наряду с чувствительностью гладких мышц к постоянному артериальному давлению существует компонент сосудистого тонуса, обусловленный пульсациями внутрисосудистого давления. S.B. Mellander [36, 77] предположил, что благодаря чувствительности гладкой мышцы к пульсациям давления последние необходимы для поддержания нормального тонуса. Однако экспериментального подтверждения эта идея не нашла, так как артерии и артериолы обладают сопоставимым тонусом как при стабильном, так и при пульсирующем давлении. Таким образом, при пульсирующей перфузии в изолированных органах имеет значение не столько эффект самого давления на гладкую мышцу, сколько ее влияние на высвобождение из эндотелиоцитов вазоактивных веществ [55, 69, 83]

1.2. Взаимоотношение «давление - кровоток» (ауторегуляция кровотока) в коронарной сосудистой системе

Прежде всего необходимо отметить, что линейной зависимости коронарного кровотока от давления в аорте нет [5, 44]. Поэтому механизмы контроля объемной скорости коронарного кровотока, к которым относится ауторегуляторное поддержание высокого тонуса гладких мышц коронарных сосудов, изменяющегося под влиянием метаболической и нервной регуляции, а также участие этих механизмов в обеспечении адекватной функции сердца представляют большой интерес.

При стабильном потреблении миокардом кислорода резкое увеличение перфузионного давления вначале приводит к кратковременному возрастанию кровотока, после чего кровоток возвращается к исходному или близко к исходному уровню, несмотря на то, что давление остается увеличенным [98]. Если давление увеличивается медленно, то поток крови вначале «устремляется» за давлением, а затем стабилизируется, хотя давление продолжает расти [112]. Этот феномен, благодаря исследованиям А.А. Остроумова (1877) [6] и W. Bayliss (1902) [18], получил название ауторегуляции кровотока.

П. Джонсон (1981) [2], а с ним и другие авторы [60] в механизме истинной ауторегуляции кровоснабжения органов признавали только миогенный компонент. Zweifach (1970) [114] указывал на ограниченность такого представления, так как в регуляции коронарного кровотока, кроме миогенного, принимают участие нейрогенный и метаболический механизмы, с чем трудно не согласиться. Под термином «ауторегуляция кровотока» понимают присущую сосудам органа способность поддерживать кровоток постоянным при изменении перфузионного давления [3]. Данное явление воспроизводится в отсутствии влияния экстракардиальной нервной системы или гормонов; более того, ауторегуляция наиболее четко проявляется, когда изменения перфузионного давления не сказываются на метаболизме органа [67].

Впервые ауторегуляцию в коронарном сосудистом русле описали R. Eckel et al. в 1949 году [52]. На сокращающемся сердце собаки было показано, что изменения перфузионного давления в канюлированной левой артерии при постоянной частоте сердечных сокращений, сердечном выбросе и системном артериальном давлении не сопровождалось возрастанием коронарного потока. Снижение артериального давления приводило к быстрому уменьшению кровотока, но впоследствии он увеличивался по направлению к исходному. Этот феномен наблюдали также в перфузируемом сердце собаки *in situ* [47], на изолированных перфузируемых сердцах морских свинок [16], крыс [111], кроликов [80], кошек [100].

Кривая, отражающая соотношение между средним коронарным артериальным давлением и кровотоком, дает важную информацию о степени и пределах ауторегуляторного процесса (рис. 1.1). Е.Б. Новиковой (1972) [5] на собаках было показано, что повышение перфузионного давления в диапазоне от 75 до 140 мм рт.ст. изменяло кровоток только на 10%. Выше и ниже указанного диапазона кровоток в значительной степени зависел от перфузионного давления.

Однако, как степень, так и границы ауторегуляции очень варьируют в зависимости от условий эксперимента: исходного тонуса венечных сосудов [5, 45], метаболических факторов [47] и состава перфузата [25, 26, 41].

Показано, что в субэпикарде и субэндокарде границы давлений, в которых наблюдается ауторегуляция, разные. А. Guyton et al. (1977) [101], измеряя при помощи меченых микросфер (15 мкм), коронарный поток во внутренних и внешних отделах миокарда левого желудочка, обнаружили, что при снижении перфузионного давления в бассейне огибающей коронарной артерии от 100 до 70 мм рт.ст., как в субэпикарде, так и в субэндокарде кровоток оставался постоянным. Когда перфузионное давление падало ниже 70 мм рт.ст., кровоток в субэндокардиальных слоях миокарда начинал снижаться

линейно с давлением, в то время как субэпикардиальный кровоток оставался постоянным вплоть до 40 мм рт.ст. Ниже 40 мм рт.ст. и в этом регионе кровоток начинал стремительно снижаться.

Подобные результаты были получены [106] при максимально расширенных венечных сосудах несокращающегося сердца. Они выявили более высокую (на 55-60%) гидравлическую проводимость сосудов, питающих глубокие слои миокарда желудочков. В отсутствии ауторегуляции при любом уровне давления в венечных артериях субэндокардиальный кровоток был значительно ниже субэпикардиального, а максимальная дилатация венечных артерий в сокращающемся сердце сопровождалась резким перераспределением кровотока в пользу наружных слоев стенки желудочка. Во время сердечного цикла также показано неравномерное трансмуральное распределение коронарного кровотока [87].

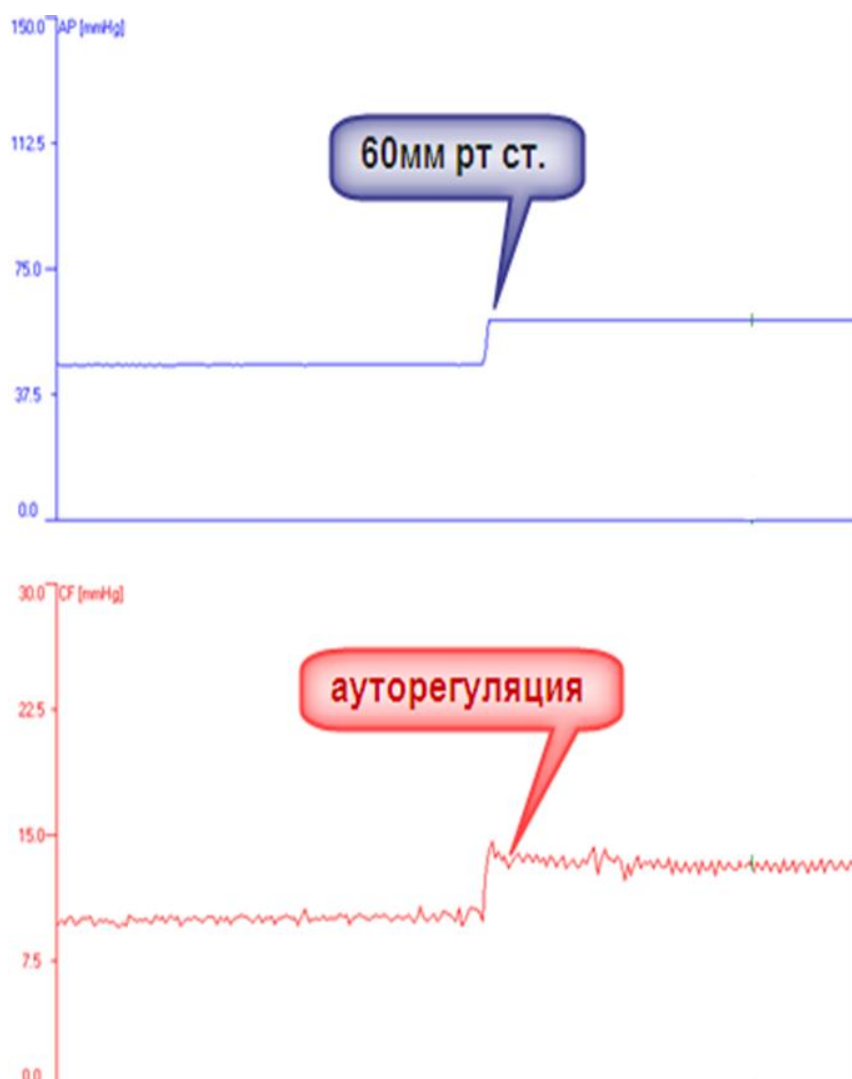


Рисунок 1.1. Оригинальная запись взаимоотношения давление-поток (ауторегуляция коронарного потока), полученная на изолированном сердце крысы при использовании установки для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных IH-SR тип 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованной датчиками для измерения объемной скорости коронарного потока (1RB-проточный, для флуометра TTFM тип 700, HSE), аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer), связанных с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА.. Здесь и на последующих рисунках: ПД (AP)- перфузионное давление, ОСКП (CF) - объемная скорость коронарного потока

При исследовании ответов на повышение давления (от 20 до 140 см водн. ст.) изолированных субэпикардиальных и субэндокардиальных артериол установлено, что миогенная ауторегуляция в эпикардиальных артериолах выражена лучше, чем в эндокардиальных, как при низких, так и при высоких значениях внутрисосудистого давления [73, 74]. Следовательно, для поддержания ауторегуляции в субэпикарде требуется меньше усилий, так как радиус сосудов здесь меньше [45]. Поэтому Н.К. Фуркало с соавт. (1986) [10] полагают, что при оптимизации кровоснабжения глубоких слоев миокарда даже в физиологических условиях используются ауторегуляторные реакции питающих сосудов, вследствие чего частично исчерпывается их расширительный резерв.

Таким образом, ауторегуляция имеет важное значение, во-первых, в поддержании постоянным гидростатического капиллярного давления [44], во-вторых, в трансмуральном перераспределении сосудистого тонуса, обеспечивающего преимущественное питание субэндокарда [33, 60], в-третьих, лежит в основе поддержания высокого базального коронарного сосудистого тонуса и, следовательно, высокого коронарного расширительного резерва в значительных интервалах перфузионного давления.

Теории ауторегуляции коронарного кровотока. В настоящее время для объяснения саморегуляции в коронарном сосудистом русле предложено 3 теории: теория тканевого давления, метаболическая и миогенная [37, 44, 64, 90].

Гипотеза тканевого давления допускает, что увеличение перфузионного давления приводит к увеличению в ткани объема крови, что сопровождается повышением выхода жидкости из сосудистого русла во внеклеточное пространство. В результате этого увеличивается тканевое давление (тургор ткани), что и является причиной сдавления тонкостенных сосудов, таких как капилляры, венулы, вены, и поэтому кровоток в ткани уменьшается. Снижение перфузионного давления приводит к обратным реакциям. Однако, данный механизм не предполагает активного реагирования сосудов на изменение давления и может иметь место только в инкапсулированных органах, где расширение ткани ограничено [54].

Проверка данной гипотезы для сердца [49, 92] показала, что хотя во время увеличения перфузионного давления интрамиокардиальное давление повышается, оно не может объяснить ауторегуляторных изменений коронарного кровотока, так как при устранении ауторегуляции введением коронародилататора изменения тканевого давления сохранялись, но не сопровождалась сдвигами коронарного кровотока.

Согласно метаболической гипотезе, кровоток при увеличении перфузионного давления остается постоянным, так как сокращение гладких мышц стимулируется субстратами или тканевыми метаболитами при изменении потребления миокардом кислорода [21]. Однако это не доказывает, что ауторегуляция коронарного кровотока при постоянном потреблении миокардом кислорода опосредуется метаболическим механизмом. Наличие ауторегуляции в сердце, не совершавшем внешней работы [111], дает основание думать о малой роли обменных факторов в этом явлении.

Учитывая, что левый желудочек экстрагирует от 70 до 80% кислорода, поступающего в артериальную кровь в условиях покоя, совершенно очевидно, что увеличение потребления миокардом кислорода должно быть в основном сбалансировано увеличением коронарной потока крови [22, 54, 96].

Чтобы понять потенциальные механизмы, ответственные за баланс между коронарным кровотоком и потреблением миокардом кислорода, важно понять, как ингибирование метаболической вазодилатации повлияет на эти взаимоотношения. Во-первых, из соотношения между коронарным кровотоком и потреблением миокардом кислорода, показанным на рис. 1.2, следует, что любое прерывание коронарного ответа на увеличение метаболизма должно происходить между нормальным (ответ в стандартных условиях) и максимальным физиологическим ответом 100% выделения кислорода. Во-вторых, с учетом ограниченного резерва экстракции кислорода миокардом снижение

метаболической коронарной вазодилатации не только уменьшит коронарный кровоток, но также уменьшит и потребление миокардом кислорода в относительном отношении к общему снижению доставки кислорода миокарда. В-третьих, если метаболическая коронарная вазодилатация полностью ингибируется экспериментально, потребление миокардом кислорода будет только увеличиваться на ~ 20-30% (в зависимости от степени исходного резерва). В совокупности эти физиологические ограничения и последствия значительно усложняют интерпретацию изменений баланса между коронарным кровотоком и метаболизмом миокарда.

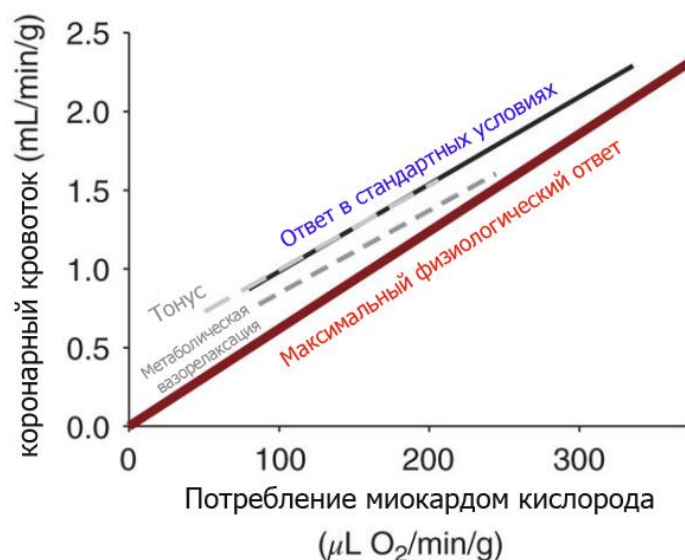


Рисунок 1.2. Взаимосвязь между коронарным кровотоком и потреблением миокардом кислорода у свиней в состоянии покоя и во время тренировки в условиях контроля, после ингибирования пути, который вызывает аналогичные сокращения коронарного кровотока и потребления кислорода миокарда (тонус), и во время состояния, которое приводит к прогрессирующим ограничениям при коронарной вазодилатации с увеличением потребления кислорода (метаболическая вазодилатация). Физиологический предел этих соотношений изображен красной линией (максимальная физиологическая реакция), которая представляет собой условие, при котором весь кислород, доставленный в экстрагированном и потребляемом (т.е. 100% -ное извлечение кислорода) [34]

Хотя широко распространено мнение о том, что локализованные вазодилататоры играют доминирующую роль в регуляции микрососудистой резистентности, точные механизмы, ответственные за неразрывное связывание коронарного кровотока с метаболизмом миокарда, по-прежнему плохо изучены [43, 51, 108]. Следует признать, что нервные (симпатические) влияния играют как косвенную, так и прямую роль в регуляции коронарного кровотока. Эти эффекты происходят через активацию сосудистых адренергических рецепторов и через увеличение потребления миокардом кислорода через увеличение частоты сердечных сокращений и сократительной способности сердца, соответственно. При рассмотрении местного метаболического контроля коронарного кровотока важно вспомнить экспериментальные результаты, с участием локальных «метаболитов». Точные критерии, определенные Фейглом в его классическом обзоре коронарного кровообращения в 1983 году, были [54]:

1. Предлагаемый метаболит высвобождается в соответствующих условиях и может быть извлечен из ткани в этих условиях.

2. Искусственная инфузия метаболита в ткань-мишень должна соответственно имитировать физиологический ответ.

3. Биохимический аппарат для получения метаболита должен локализоваться в ткани в соответствующих местах.

4. Механизмы инактивации и / или поглощения метаболита осуществляются в соответствующих местах локализации.

5. Действие различных агентов на синтез, высвобождение, мишень рецепторная функция или инактивация метаболитов должны иметь последовательные эффекты с гипотезой.

6. Количественные исследования должны указывать, что количество и продолжительность курса

7. высвобождение метаболита в физиологических условиях подходит для определения данного эффекта.

Однако есть работы, в которых показано, что характер зависимости коронарного потока от давления зависит от метаболических факторов. R. Berne (1959) [21] наблюдал выраженные различия во взаимоотношении «коронарное давление – поток», когда снижал температуру миокарда от 37⁰С до 21⁰С. При нормотермии наблюдалась выраженная ауторегуляция в диапазоне перфузионного давления 120 – 40 мм рт.ст., в то время как при гипотермии изменения в коронарном потоке были значительно больше, чем изменения в давлении, указывая на то, что ауторегуляция была ослаблена или полностью отсутствовала.

A. Drake-Holland et al. (1984) [89] изучали зависимость коронарного потока от давления в широком диапазоне изменения частоты сердечных сокращений (от 60 до 180 ударов в 1 минуту). Падение коронарного перфузионного давления приводило к снижению сопротивления сосудов сердца, и, как следствие, уменьшалась артерио-венозная разница кислорода и наблюдалось небольшое снижение потребления миокардом кислорода.

Увеличение частоты сердечных сокращений приводило к одностороннему сдвигу кривой «давление – поток». Другие авторы описали параллельные сдвиги кривой «давление – поток» в сердце собаки, перфузируемой кровью, во время увеличения частоты сердечных сокращений [61, 71] и во время стимуляции желудочков парными импульсами [48]. Следовательно, различия в степени ауторегуляции сосудов, обычно обусловленные изменением потребления кислорода, могут быть объяснены тем, что увеличение частоты сердечных сокращений оказывало влияние на напряжение кислорода в миокарде [46, 47].

Е.Б. Новиковой (1972) [5] показано, что при заведомо сниженном поступлении кислорода к сердцу, обусловленном введением питуитрина, наблюдалось усиление ауторегуляторного сужения коронарных сосудов при увеличении перфузионного давления. Это может указывать на то, что уровень кислорода в данном случае не влиял на процесс ауторегуляции. Кроме того, сравнение индексов ауторегуляции, полученных при подъеме и при снижении перфузионного давления, показало, что возврат кровотока к исходным величинам, происходил более полно после подъема давления, чем после падения. Это наблюдение дало основание говорить об исключительно миогенной природе явления: реакцию гладких мышц вызывает их растяжение [8]. Тот факт, что при перфузии коронарных сосудов пульсирующим потоком их тонус был выше, чем при перфузии постоянным потоком, подтверждает эту точку зрения [6, 35].

Таким образом, в настоящее время нет данных, которые позволили бы приписать решающую роль в ауторегуляторном процессе постоянному воздействию на сосуды химических веществ, образующихся вне сосудистых стенок.

Миогенная гипотеза основывается на том, что сосудистые гладкие мышцы сокращаются в ответ на растяжение и расслабляются при снижении их напряжения. Следовательно, прирост кровотока, вызванный резким подъемом перфузионного

давления, первоначально является следствием пассивного следования давлению, но затем в результате сокращения сосудистых гладких мышц он возвращается к исходному уровню [4]. Подобную зависимость силы сокращения от длины мышцы объясняют изменениями степени перекрытия нитей актина и миозина. Применимо ли это, разработанное для скелетных мышц, представление и к миоцитам сосудов, неизвестно, но его считают весьма общим [66]. С.Б. Шишкиным с соавт. (1984) [11] на изолированных полосках крупных (1,5 мм) и мелких коронарных артерий (400 – 500 мкм) было показано, что повышение статистической нагрузки от 1000 до 2000 мг на препарате крупных коронарных артерий, в отличие от мелких, не сопровождалось статистически значимым изменением сократительной активности миоцитов на введение ионов K^+ . Ими было высказано предположение, что при колебаниях коронарного перфузионного давления в основном изменяется деятельность сократительного аппарата мелких коронарных артерий.

Плохо объяснимым пунктом миогенной теории является факт, что при увеличении перфузионного давления поток остается постоянным. Для осуществления подобной реакции необходимо, чтобы калибр резистивных сосудов уменьшился до диаметра меньшего, чем тот, который наблюдался до увеличения перфузионного давления. Важно знать, что же поддерживает сократительную реакцию подобной величины [64].

Существует точка зрения, что контролируемой величиной является напряжение стенки сосуда [64, 65]. Согласно закону Лапласа наиболее существенной силой, влияющей на просвет сосуда, является трансмуральное давление (разница между давлением внутри и снаружи сосудов), создающее исходное напряжение. Увеличение трансмурального давления ведет к растяжению сосуда, если при этом не активируется гладкая мышца. В свою очередь, при повышении внутрисосудистого давления возбудимые элементы гладкомышечных клеток приходят в рабочее состояние, что инициирует процесс сокращения, а последний снимает или снижает деформацию и, следовательно, диаметр сосуда, который стабилизируется при величине меньшей, чем его исходное значение. Однако, как установил Р. Johanson (1981) [65], сосуд не суживается до диаметра, при котором поток возвращается к контрольному. Всегда существует небольшое несоответствие, которое определяет сигнал-ошибки, необходимый для поддержания сокращения гладкомышечных клеток.

Сократительная реакция в ответ на механическое воздействие определяется процессами, лежащими в основе сопряжения возбуждения и сокращения в гладких мышцах, в том числе и сосудистых. Мышцы сосудов можно рассматривать как «механорецепторы» со встроенной сократительной системой [12]. При сокращении происходит уменьшение длины клетки, что прекращает действие ее мембраны как «рецептора» растяжения. Это лежит в основе «парадокса» укорочения. Если гладкую мышцу, находящуюся в состоянии некоторого тонического напряжения, растянуть, то в ней проявится зависимость сократительной силы от длины. Если мышца чувствительна к удлинению, растяжение будет приводить к более полной активации сократительной системы, и тогда развиваемая гладкой мышцей сила повысится в большей степени. При этом жесткость сосуда увеличивается и ослабляется растягивающее действие внутрисосудистого давления.

Б. Фолков (1976) [9] предположил, что сосуды сопротивления отвечают на растяжение увеличением частоты сокращений гладких мышц. Это возможно при увеличении генерации потенциалов действия. Если принять во внимание этот механизм, то гладкомышечные компоненты резистивных сосудов после подъема давления в целом должны находиться более длительное время в состоянии сокращения, чем до него. Суммарный эффект, следовательно, будет увеличивать тонус сосудов.

Молекулярный механизм миогенного ответа. В настоящее время многие звенья в механизме генерации миогенного ответа остаются неизвестными, однако в его раскрытии достигнут значительный прогресс [39, 40, 78].

Можно выделить несколько гипотез, объясняющих последовательность событий, которые связывают между собой изменение внутрисосудистого давления или растяжение стенки сосуда и изменение функционального состояния сократительного аппарата гладкомышечных клеток. Первая гипотеза *электромеханического сопряжения* объясняет данное взаимодействие изменением мембранного потенциала и открытием чувствительных к растяжению ионных каналов [58], вторая - *изменением соотношения внутриклеточных посредников* [99]. В последнее время уделяется большое внимание *эндотелийзависимой модуляции сосудистого тонуса*.

Электромеханическое сопряжение. Сенсор, воспринимающий внутрисосудистое давление, все еще не найден. В гладкой мышце коронарных сосудов идентифицированы чувствительные к растяжению неселективные катионные каналы [40], которые, возможно, и являются механочувствительными к изменению внутрисосудистого диаметра. Эти каналы активируются растяжением и ответственны за вход внутрь клетки катионов, приводящих к развитию деполяризации мембран гладкомышечных клеток, которая, в свою очередь, активирует потенциалзависимые кальциевые каналы и последующий вход ионов кальция внутрь клетки. Необходимо заметить, что вход ионов кальция через чувствительные к растяжению кальциевые каналы, в свою очередь, также непосредственно может способствовать высвобождению ионов кальция из внутриклеточных депо.

Ряд ученых [23, 27, 70, 97, 113] установили, что миогенный тонус артериоларных сосудов находится в прямой связи с активностью кальцийзависимых калиевых каналов. Увеличение внутрисосудистого давления, деполяризуя мембраны гладкомышечных клеток, приводит к увеличению их проницаемости для ионов кальция, что, в свою очередь, активирует кальцийзависимые калиевые каналы (КСа-каналы) и выход калия из клетки [28]. Таким образом, заключают авторы, увеличение проницаемости данных калиевых каналов представляет собой механизм отрицательной обратной связи, контролирующей степень деполяризации мембран гладкомышечных клеток, а, следовательно, и ее выраженность.

На рисунке 3 показана возможная цепь реакций, лежащая в основе механизма создания миогенного тонуса коронарных сосудов, а также компенсаторное противодействие ему. Известно, что растяжение гладкой мышцы приводит к деполяризации ее мембраны и увеличению спайковой активности [24, 31, 95]. Данная деполяризация лучше коррелировала с напряжением, чем с длиной гладкой мышцы. Это привело к заключению, что окружное напряжение является основной переменной миогенного ответа артериол.

Изменение соотношения внутриклеточных посредников. Существуют доказательства, полученные на артериолах почки, что метаболиты арахидоновой кислоты, 20-гидроксиэйкозотетраеновая кислота при участии Р450 монооксигеназного пути ингибируют КСа-каналы гладкомышечных клеток и играют важную роль в инициации и/или поддержании миогенного тонуса [30, 59, 62]. Кроме того, важным медиатором миогенного ответа являются чувствительные к растяжению неселективные катионные каналы и фосфолипаза С. С использованием почечных артерий собаки было показано, что в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации инозитолтрифосфата (IP3) и диацилглицерола происходит повышение внутрисосудистого давления [17, 84].

До настоящего времени не ясно, каким образом изменение внутрисосудистого давления активирует фосфолипазу С. Вероятно, что протеинкиназа С вовлечена в развитие миогенного ответа сосудистой стенки. Так, блокатор протеинкиназы С кальфостин С в коронарных артериях человека ингибирует появление миогенной констрикции и усиливает констрикторное действие форболового эфира [79, 102], повышая чувствительность сократительных белков к ионам кальция и его вход через потенциалзависимые кальциевые каналы [14, 68].

Эндотелийзависимая модуляция сосудистого тонуса. Одним из локальных механизмов регуляции сосудистого тонуса является эндотелийзависимая регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток артериальных сосудов. В основе этой регуляции лежит способность эндотелиоцитов синтезировать и высвобождать большое количество разнообразных соединений, обладающих вазоактивными свойствами.

Во многих артериолах внутренняя эластическая мембрана фенестрирована, что позволяет гладкомышечным клеткам прямо контактировать с эндотелиоцитами. Е.С. Carlson с соавт. (1982) [29, 81] предположили, что при повышении внутрисосудистого давления деформация эндотелиальных клеток через фенестры способна деформировать мембрану гладкомышечной клетки. По-видимому, это приводит к увеличению проницаемости мембраны гладкомышечной клетки к ионам кальция и к активации мышечного сокращения. В итоге деформация гладкомышечной клетки исчезает. Недостатком данного объяснения является то, что на основании его не ясно, каким образом происходит укорочение гладкой мышцы до длины меньшей, чем исходная. Все же, подобная миоэндотелиальная связь является хорошо выраженной в сосудах брыжейки, в междольковых и афферентных артериолах почки - сосудах, обладающих выраженными миогенными реакциями [57, 104]. Подобные миоэндотелиальные контакты, как правило, локализуются в местах наиболее выраженного напряжения сосудистой стенки [82, 103]. Данные контакты между эндотелиальными и гладкомышечными клетками позволяют молекулам быстро проникать из интимы к медию сосудистой стенки. Однако, на основании данного механизма невозможно объяснить индуцированное растяжением повышение тонуса артерии уха кролика, наступающее при удалении эндотелия [61, 71, 78].

артериального давления в мозговых артериях кошки сопровождалось уменьшением разности потенциалов на мембране гладкомышечных клеток на 0.35 мВ/мм рт. ст. При повреждении эндотелия коллагеназой - деполяризации не наблюдалось. Однако некоторые авторы не обнаруживают связи между эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками [20]. К сожалению, неизвестно строение и плотность данных каналов в мембране эндотелиоцита.

Если под влиянием растяжения мембраны эндотелиоцитов деполяризуются, то электротонически могут деполяризоваться мембраны гладкомышечных клеток сосудистой стенки.

Возможный механизм эндотелийзависимого сокращения гладкомышечных клеток сосудистой стенки при увеличении внутрисосудистого давления предложил S.P.Olesen с соавт. (1987) [88]: небольшое напряжение сдвига эндотелиоцитов сопровождается открытием калиевых каналов и выходом катионов из клетки, что тем самым способствует гиперполяризации мембраны эндотелиоцитов. Более значительное напряжение сдвига приводит к открытию чувствительных к растяжению кальциевых каналов в мембране эндотелиоцитов. Следовательно, ионы кальция по концентрационному и электрическому градиенту поступают внутрь эндотелиоцита. Эта комбинация сигналов может сопровождаться высвобождением из эндотелиоцитов веществ, обладающих выраженными констрикторными свойствами (например, эйкозаноиды, эндотелин), которые будут воздействовать на прилегающие к эндотелию гладкомышечные клетки.

Другим предполагаемым участком в клетке, воспринимающим изменение напряжения ее мембраны, являются плотные тельца, связанные с мембраной и сократительными элементами клетки. Следовательно, степень деформации мембраны должна быть точно передана на сократительный аппарат. Микроучасткам мембраны, соседним с плотными ее областями, приписывается способность «чувствовать» растяжение: подвергаясь деформациям, пропорциональным усилию сократительной системы клетки, они могли бы оставаться растянутыми даже при укорочении клетки в целом. Совокупность таких участков, расположенных последовательно с сократительным аппаратом клеток, могла бы «измерять» общее окружное натяжение стенки сосуда.

Приведенные данные позволяют сделать заключение, что артериальная, а если быть более точным, артериолярная часть сосудистого русла обладает наиболее ярко выраженной способностью отвечать на изменения внутрисосудистого давления. Следовательно, феномен ауторегуляции, можно сказать, является, производным тонуса артериол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибкова, И. В. Исследование действия NO на кальций-активируемый калиевый канал гладкомышечных клеток артерии крысы / И. В. Грибкова, Р. Шуберт, В. Н. Серебряков // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2002. – № 9. – С. 1199-1200
2. Джонсон, П. Периферическое кровообращение. – М.: Медицина, 1981. – С.440.
3. Конради, Г.П. Регуляция сосудистого тонуса. – Л.: Наука, 1973. – С.328.
4. Кривченко, А.И. Количественные характеристики ауторегуляция органного кровотока / А.И.Кривченко, Б.Б. Ирипханов // Физиол. журн. СССР. – 1987. – Т.73, № 1. – С.91-96
5. Новикова, Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе / Е.Б. Новикова // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1972. – Т.58, N 1. – С. 61-72
6. Овсянников, В.И. Миогенная констрикция артериальных сосудов миокарда при увеличении пульсации коронарного перфузионного давления / В.И.Овсянников // Физиол. журн. СССР. – 1975. – Т.6, № 8. – С.1222-1227
7. Ткаченко, Б.И. Основы физиологии человека / Б.И. Ткаченко. – М.: Литера. – 1998. – Т. 3. – С. 248.
8. Трубецкой, А.В. Физиология и патофизиология коронарного кровообращения / А.В. Трубецкой // Бюлл. ВКНЦ. – 1981. – Т.4, № 1. – С. 95-102
9. Фолков, Б., Нил Э. Кровообращение. – М.: Медицина, 1976. – С.635
10. Фуркало, Н.К., Братусь, В.Д., Фролькис, Р.А. Коронарная недостаточность: кровоснабжение, функция и метаболизм миокарда. – Киев: Наукова думка, 1986. – С.212
11. Шишкин, С.Б. Влияние статической нагрузки на сократительную активность миоцитов мелких коронарных артерий / С.Б.Шишкин, А.Г.Баранов, О.П. Чебуков // Физиол. журн. СССР. – 1984. – Т.70, № 1. – С.38-41
12. Abel, R.M. Effects of coronary blood flow and perfusion pressure on left ventricular contractility in dog / R.M.Abel, R.L.Reis // Circ. Res. – 1970. – Vol.27. – P.961-971
13. Aguilar-Bryan, L. Of mice and men: KATP channels and insulin secretion / L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, M. Nakazaki // Recent Prog. Horm. Res. – 2001. – Vol. 56. – P. 47-68.
14. Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure / M.S. Taylor [et al.] // Circ. Res. – 2003. – Vol. 93. – P. 124-131.
15. Autoregulation of coronary blood flow in the isolated beating pig heart. / Schampaert S [et al] // Artif Organs. – 2013. – Vol.37, №8. – P.724-30. doi: 10.1111/aor.12065.
16. Bardenhener, H. Relationship between myocardial oxygen consumption, coronary flow and adenosine rebase in an improved isolated working heart preparation in guinea pigs / H.Bardenhener, J.Schrader // Circ. Res. – 1983. – Vol.51. – P.263-271.
17. Bavencoffe, A. New Aspects of the Contribution of ER to SOCE Regulation: TRPC Proteins as a Link Between Plasma Membrane Ion Transport and Intracellular Ca^{2+} Stores. / A.Bavencoffe, M.X. Zhu, J.B. Tian // Adv Exp Med Biol. –2017. –Vol. 993. – P.239-255. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_13.
18. Bayliss, W.M. On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure / W.M. Bayliss // J. Physiol. (Lond). – 1902. – Vol.28. – P.220-231.
19. Bell, E.D. Cerebrovascular dysfunction following subfailure axial stretch. / E.D. Bell, A.J. Donato, K.L. Monson // J Mech Behav Biomed Mater. – 2017. – Vol.65. – P.627-633. doi: 10.1016/j.jmbbm.
20. Beny, J.I. Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled / J.I. Beny // Am. J. Physiol. – 1990. – Vol. 258 (Heart circ.physiol.27). – P.H836-H841
21. Berne, R. Regulation of coronary blood flow / R.Berne, R.Rubio // Progr. Cardiovasc. Dis. – 1975. – Vol.18. – P.105-122
22. Berne, R.M. Regulation of coronary blood flow. / Berne R.M. // Physiol Rev. – 1964; Vol. 44. – P. 1–29. [PubMed: 14106816]

23. Brayden, J.E. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels / J.E.Brayden, M.T Nelson. // *Science*. – 1992. – Vol.256, № 5056. – P.532-535
24. Bulbring, E. Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle / E.Bulbring // *J. Physiol (Lond)*. – 1955. – Vol.128. – P.200-221
25. Bunger R., Haddy F.J., Querengasser A. et al. An isolated guinea pig heart preparation with in vitro like features // *Pflug. Arch*. – 1975. – Vol.353. – P.317-326
26. Bunger R.M., Lowenstein J.M. Preparation and properties of 5-nucleotidase from smooth muscle of small intestine // *J. Biol. Chem*. – 1970. – Vol.245. – P.6274-6280
27. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone / J. Ledoux [et al.] // *Physiology*. – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 69-78.
28. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase / A. Scott [et al.] // *J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol*. – 2003. – Vol. 284. – P. 1004–1011.
29. Carlson, E.C. Electron microscopic studies of cat mesenteric arterioles: A structure-function analysis / E.C. Carlson, M.E.Burrows, P.C. Johnson // *Microvasc. Res*. – 1982. – Vol.24. – P.123-141
30. Central Role of P2Y6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone / G.Kauffmanstein, [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2016. – Vol. 36, №8. – P.1598-606. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307739.
31. Chilian, W. M. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle / W. M.Chilian, C. L.Eastham, M. L.Marcus // *Am. J Physiol*. – 1986. – Vol. 251. – P. H779-H788
32. Coffman, J.D. Reactive hyperemic characteristics of the myocardium / J.D. Coffman, D.E. Gregg // *Am. J. Physiol*. – 1960. – Vol.199. – P.1143-1147
33. Contractile heterogeneity in ventricular myocardium. / W.Pan [et al.] // *J Cell Physiol*. – 2018. doi: 10.1002/jcp.26512
34. Contribution of voltage-dependent K(+) channels to metabolic control of coronary blood flow / Z.C. Berwick [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2012. – Vol. 52. – P. 912–919. [PubMed: 21771599]
35. Coronary Microcirculatory Dysfunction in Human Cardiomyopathies: A Pathologic and Pathophysiologic Review. / Selthofer-Relatic K [et al] // *Cardiol Rev*. – 2017. – Vol. – 25, №4. – P. 165-178. doi: 10.1097/CRD.000000000000140.
36. Coronary vasomotor responses to isometric handgrip exercise are primarily mediated by nitric oxide: a noninvasive MRI test of coronary endothelial function. / A.G. Hays [et al] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2015. – Vol.308, №11. – P.H1343-50. doi: 10.1152/ajpheart.00023.
37. Crystal Right Ventricular Perfusion: Physiology and Clinical Implications. / G.J.Crystal, P.S.Pagel // *Anesthesiology*. – 2018. – Vol.128, №1. – P.202-218. doi: 10.1097/ALN.0000000000001891.
38. Das, B. Is preconditioning by oxytocin administration mediated by iNOS and/or mitochondrial K(ATP) channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart? / B. Das , C. Sarkar // *Life Sci*. – 2012. Vol. 90(19-20) - P. 763-769.
39. Davis, M.J. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response / M.J.Davis, M.A. Hill // *Physiol Rev*. – 1999. Vol. 79. – P.387-423.
40. Davis, M.J. Stretch-activated single-channel and whole-cell currents in vascular smooth muscles / M. J.Davis, J.A.Donovitz, J.D.Hood // *Am J.Physiol*. – 1992. – Vol.262, №4 Pt 1. – P.C1083-C1088.
41. Day, S.B. Pressure-flow relationship in isolated perfused rabbit heart / S.B.Day, J.A. Johanson // *Am. J. Physiol*. – 1976. – Vol.196. – P.1289-1291
42. Decreased coronary reserve a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries / M.L. Marcus [et al.] // *N. Engl. J. Med*. - 1982. - Vol.307. - P.1362-1364.

43. Deussen A, Ohanyan V, Jannasch A, Yin L, Chilian W. Mechanisms of metabolic coronary flowregulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52:794–801. [PubMed: 22004900]
44. Dole, W.P. Autoregulation of the coronary circulation | W.P. Dole // *Progr. Cardio. Diseases.* – 1987. – Vol.29, N 4. – P. 293-323
45. Dole, W.P. Myocardial oxygen tension determines the degree and pressure range of coronary autoregulation / W.P. Dole, D.W. Nuno // *Circ. Res.* – 1986. – Vol.59. – P.202-215
46. Dole, W.P., Montville W.J., Bishop U.S. Dependency of myocardial reactive hyperemia on coronary artery pressure in the dog // *Am. J. Physiol.* – 1981. – Vol.240. – P. 709-715
47. Dole, W.P., Nuno D.W. Dependency of coronary autoregulation on myocardial oxygenation / W.P. Dole, D.W. Nuno // *Circulation.* – 1984. -Vol.70. – P.231.
48. Downey, J.M. Myocardial contractile force as a function of coronary blood flow / J.M. Downey // *Am. J. Physiol.* – 1976. – Vol.230. – P.1-6
49. Driscoll, T.E. Vascular effects of changes in perfusion pressure in the non-ischemic and ischemic heart / T.E. Driscoll, T.W.Moir, R.W. Eckstein // *Circ. Res.* – 1964 (Suppl. 1). – Vol. 15. – P.94-102
50. Duling, B.R. Microvascular responses to alterations in oxygen tension / B.R. Duling // *Circ. Res.* – 1972. – Vol.31. – P.481-486.
51. Duncke, D.J. Regulation of coronary resistance vessel tone in response to exercise / D.J. Duncker, R.J. Bache, D.Merkus // *J Mol Cell Cardiol* – 2012. – Vol. 52. – P.802–813. [PubMed: 22037538]
52. Effects of over and under perfusion upon coronary arterial blood flow / R.Eckel [et al] // *Fed. Proc.* – 1949. – Vol.8. – P.38.
53. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. / S. Wang [et al.]. // *J Clin Invest.* – 2016. – Vol. 126, №12. – P. 4527-4536. doi: 10.1172/JCI87343.
54. Feigl, E. Coronary physiology / E. Feigl // *Physiol. Rev.* – 1983. – Vol.63, N 1. – P.1-207
55. Fenerstein, G. Lipid peroxides and the Coronary Circulation / G. Fenerstein, R.E. Goldstein // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1987. – Vol.136, № 2. – P.485-487.
56. Folkow, B. Myogenic mechanisms in the control of systemic resistance: introduction and historical background / B. Folkow // *J. Hypertens.* – 1989. – Vol. 7, Suppl. 4. – P. S1–S4.
57. Gairhe, S. Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells. / S.Gairhe, N.N. Bauer, S.A. Gebb, I.F.McMurtry // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2011. – Vol. 301, №4. – P. L527-535. doi: 10.1152/ajplung.00091.
58. Hamill, O.P. Improved path-clamp techniques for high-resolution current recording from cells-free membrane pathes / O.P.Hamill, A.Marty, E.Neher // *Pfluegers Arch.* – 1981. – Vol. 391. – P.85-100
59. Hill, M. A. Calcium dependence of indolactam-mediated contractions in resistance vessels / M. A.Hill, M. J. Davis, J. B.Song, H.Zou // *J. Pharmacol Exp Ther.* – 1996. – Vol. 276. – P.867-874.
60. Hoffman J. Transmural myocardial perfusion // *Progr. Cardio. Diseases.* – 1987. – Vol.29, N 6. – P.429-464; Schaper, W. Wechswirkungen zwischen gefa□-wand und blutzllen / W.Schaper, J.Schaper // *Hamostasiologie.* – 1981. – Vol.1. – P.3-26
61. Hwa, J.J. Stretch-dependent (myogenic) tone in rabbit ear resistance arteries / J.J.Hwa, J.A. Bevan // *Am.J.Physiol.* – 1986. – Vol. 250. – P. H87- H95
62. Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dog renal arcuate arteries / K.Kauser [et al.] // *Circ Res.* – 1991. – Vol.68. – P.1154-1163
63. Jackson, W. F. Ion Channels and Vascular Tone / W. F. Jackson // *Hypertension.* – 2000. – Vol. 35. – P. 173-178
64. Johanson, P. Autoregulation of blood flow / P.Johanson // *Circ. Res.* – 1986. – Vol.59, N 5. – P.483-495
65. Johanson, P. The role of intravascular pressure in regulation of the microcirculation / P. Johanson // *Adv. Physiol. Sci.* – 1981. – Vol.7. – P.17-34

66. Johansson, B. Static and dynamic changes in the vascular myogenic response to passive changes in length as revealed by electrical and mechanical recordings from the rat portal vein / B. Johansson, M.Mellander // *Circ. Res.* – 1975. – Vol. 36, N 1. – P.76-83
67. Johnson, P.C. Autoregulation of blood flow / P.C. Johnson // *Circ.Res.* – 1986. – V.59, N 5. – P. 483-495.
68. Johnson, P.C. The myogenic response in the microcirculation with other control systems / P.C. Johnson // *J. Hypertens.* – 1989. – Vol. 7. – (Suppl. 4). – P. S33-S40
69. Kim, Y.C. Protein kinase C mediates the desensitization of CCh-activated nonselective cationic current in guinea-pig gastric myocytes / Y.C.Kim [et al] // *Pflügers Arch.* – 1998. – Vol. 436. – P. 1-8.
70. Knot, H. J. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K1 channels in rabbit myogenic cerebral arteries / H. J.Knot, M. T. Nelson // *Am J Physiol.* – 1995. – Vol.269, № 1(Pt 2). – P.H348-H355
71. Kroll, K. Extracorporeal circulation system for coronary artery perfusion in the closed-chest dog / K.Kroll, F.F.Hendriks, I.I.Schipperheyn // *Am. J. Physiol.* – 1979. – Vol. 236. – P.652-656
72. Kunzelman, K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease / K. Kunzelman, M. Mall // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 245-289.
73. Kuo, L. Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles / L. Kuo, M.J. Davis, W.M. Chilian // *Am. J. Physiol.* – 1988. – Vol. 255, N 6. – P. 1558-1562
74. Lamontagne, D. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endotheliumderived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed / D.Lamontagne, U.Pohl, R.Busse // *Circ. Res.* – 1992. – Vol.70. – P.123-130
75. Lansman, J.B. Single, stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers / J.B. Lansman, T.J.Hallan, T.J. Rink // *Nature.* – 1987. – Vol.325. – P.811-813.
76. Marcus, M. L. Basic regulatory mechanisms in the coronary circulation / M. L. Marcus // *The Coronary Circulation in Health and Disease.* – 1983. – P. 65-187.
77. Mellander, S. Vascular adjustments to increased transmural pressure in cat and man with special reference to shifts in capillary fluid transfer / S. Mellander, B. Oberg, H. Odelram // *Acta Physiol. Scand.* – 1964. – Vol.61. – P.34-48.
78. Mentz, P. The dependence of cardiac eicosanoid effects on changes of calcium concentration / P.Mentz, K.E.Pawelski // *Biomedica Biochemica Acta.* – 1984. – Vol.43, № 8/9. – P. 167-170
79. Miller, F. J., Jr., Dellsperger, K. C., & Gutterman, D. D. Myogenic constriction of human coronary arterioles / F.J.Miller, K.C. Dellsperger, D.D.Gutterman // *Am J. Physio.* – 1997. – Vol. 273, № 1 (Pt 2). – P.H257-H264
80. Moretti, R.L.The stimulation of cardiac prostaglandins production by blood plasma and its relationship to the regulation of coronary flow in isolated isovolumic rabbit hearts / R.L.Moretti, S.Abraham, K.Eckel / J.Shepherd // *Circ. Res.* – 1976. – Vol.39. – P.231-238.
81. Multi-physics interactions drive VEGFR2 relocation on endothelial cells. / V.Damioli, A. Salvadori, G.P. Beretta, C. Ravelli, S. Mitola // *Sci Rep.* – 2017. – Vol.7, №1. – P.16700. doi: 10.1038/s41598-017-16786-4.
82. Myoendothelial contacts, gap junctions, and microdomains: anatomical links to function? / Sadow SL1, Senadheera S, Bertrand PP, Murphy TV, Tare M. // *Microcirculation.* – 2012. – Vol.19, №5. – P. 403-415. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00146.x.
83. Namani, R. Integrative model of coronary flow in anatomically based vasculature under myogenic, shear, and metabolic regulation. / R. Namani, G.S. Kassab, Y. Lanir // *J Gen Physiol.* – 2018. – Vol.150, №1. – P.145-168. doi:10.1085/jgp.201711795.
84. Narayanan, J. Pressurization of isolated renal arteries increases inositol triphosphate and diacylglycerol / J.Narayanan, M.Imig, R. J.Roman, D. R. Harder // *Am J Physiol.* – 1994. – Vol. 266, №5 (Pt 2). – P.H1840-H1845

85. Nelson, M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M.T. Nelson, J.M. Quayle // *J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 799–822.
86. Nilius, B. Ion channels and their functional role in vascular endothelium / B. Nilius, G. Droogmans // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1415–1459.
87. Nonuniformity of the transmural distribution of coronary blood flow during the cardiac cycle / D.Rovai [et al.] // *Circulation.* – 1989. – Vol. 79, N 1. – P.179-W
88. Olesen, S.P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells / S.P.Olesen, D.E.Clapham, P.F. Davies // *Nature.* – 1987. – Vol. 331. – P. 168-170
89. Oxygen and coronary vascular resistance during autoregulation and metabolic vasodilatation in the dog / A.J.Drake-Holland [et al.] // *J. Physiol. (Lond.).* – 1984. – Vol.348. – P.285-299
90. Physiological insights of recent clinical diagnostic and therapeutic technologies for cardiovascular diseases. / K.Shigemi [et al.] // *J Physiol Sci.* – 2017. – Vol. 67, №6:655-672. doi: 10.1007/s12576-017-0554-8.
91. Pogoda, K. NO, via its target Cx37, modulates calcium signal propagation selectively at myoendothelial gap junctions. / K.Pogoda, M.Füller, U.Pohl, P.Kameritsch // *Cell Commun Signal.* – 2014. – Vol. 12. – P. 33. doi: 10.1186/1478-811X-12-33.
92. Pranskunas, A. Microcirculatory effects of L-arginine during acute anaerobic exercise in healthy men: A pilot study. / A.Pranskunas, Z.Pranskuniene, J.Bernatoniene, E.Vaitkaitiene, M.Brazaitis // *J Exerc Sci Fit.* – 2015. – Vol.13. – №2. – P.57-62. doi: 10.1016/j.jesf.2015.04.001.
93. Preprocedural fractional flow reserve and microvascular resistance predict increased hyperaemic coronary flow after elective percutaneous coronary intervention. / T. Murai [et.al] // *Catheter Cardiovasc Interv.* – 2017. – Vol.89, №2. – P. 233-242. – doi: 10.1002/ccd.26596.
94. Pressure releases a transferable endothelial constrictor factor in cat cerebral arteries / D.R. Harder, [et al.] // *Cir.res.* – 1989. – Vol.65. – P. 193-198
95. Pressure-induced oxidative activation of PKG enables vasoregulation by Ca²⁺ sparks and BK channels / K.Khavandi [et al.] // *Sci Signal.* – 2016. – Vol.9. – P. 449: ra100. doi: 10.1126/scisignal.aaf6625
96. Raunwald, E. Control of myocardial oxygen consumption: Physiologic and clinical considerations / E.Raunwald // *Am J Cardiol.* – 1971. – Vol. 27. – P. 416–432. [PubMed: 4396726]
97. Roman, R.J. Commentary on the special issue on the impact of myogenic tone in health and disease / R.J.Roman, R.P. Van Dokkum // *Curr Vasc. Pharmacol.* – 2014. – Vol.12, №6. – P.779.
98. Schaper, W. Pathophysiology of coronary circulation and acute coronary insufficiency / W.Schaper, J.Schaper, H.M. Hoffmeister // *Clin. Pharmacol. Antiang. Drugs.* – Berlin. – 1985. – P.47-96.
99. Shearmann, M.S. Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family / M.S.Shearmann, K.Sekiguchi, Y.Nishizuka // *Farmacol. Rev.* – 1989. – Vol.41. – P. 211-237
100. Shepherd, J. Mechanisms responsible for coronary vasospasm / J.Shepherd // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1986. – Vol.8, N 1. – P.50-54.
101. Significance of subendocardial S-T segment elevation caused by coronary stenosis in the dog heart / A.Guyton [et al.] // *Circ. Res.* – 1977. – Vol.40. – P.373-380
102. Slish, D.F. Diacylglycerol and protein kinase C activate cation channels involved in myogenic tone / D.F. Slish, D.G.Welsh, J.E. Brayden // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – Vol.283, №6. – P.H2196-201.
103. Sosa-Melgarejo J., Berry C.L. Myoendothelial contacts in the human fetal aorta / J.Sosa-Melgarejo, C.L. Berry // *Archives of medical research.* – 1995. – Vol. 26, № 4. – P. 431-437
104. Sosa-Melgarejo, J. Myoendothelial contacts in the thoracic aorta of rat fetuses / J.Sosa-Melgarejo, C.L. Berry // *J.Pathol.* –1992. – Vol. 166. – P. 311-319

105. The influence of elective percutaneous coronary intervention on microvascular resistance: a serial assessment using the index of microcirculatory resistance. / T. Murai [et.al] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2016. – Vol. 311, №3. – P. H520-31. doi: 10.1152/ajpheart.00837
106. The role of autoregulation and tissue diastolic pressure in the transmural distribution of left ventricular blood flow in anesthetized dogs / J.Rouleau [et al.] // *Circ. Res.* – 1979. – Vol.45. – P. 804-815
107. Tingcun, Zhao Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Delayed Myocardial Protection Induced by Activation of Adenosine A1 Receptors Evidence From Gene-Knockout Mice / Zhao Tingcun, Xi Lei, Chelliah Jeya, E. Levasseur Joseph, C. Kukreja Rakesh // *Circulation.* – 2000. – Vol. – 102. – P.902-907.
108. Tune, J.D. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption / J.D.Tune, M.W. Gorman, E.O. Feigl // *J Appl Physiol.* – 2004. – Vol. 97. – P.404–415. [PubMed: 15220323]
109. Vascular ATP-dependent potassium channels, nitric oxide, and human forearm reactive hyperemia / A. J. Bank [et al.] // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2000. – Vol. 14. – P. 23–29.
110. Waugh, W. H. Circulatory autoregulation in the fully isolated kidney and in the humorally supported, isolated kidney / W. H. Waugh // *Circ. Res.* – 1964. – Vol.15, №1. – P. 156-169.
111. Weisfeldt, M. Effect of perfusion pressure on coronary flow and oxygen usage of nonworking heart / M.Weisfeldt, N.Shock // *Am. J. Physiol.* – 1970. – Vol.218, № 1. – P.95-101.
112. Weiss, M.U. Koronare autoregulation des isolierten herzens / M.Weiss, U.Zehl, W.Förster // *Acta biol. medica Germanica.* – 1978. – Vol.37, № 2. – P.179-373.
113. Wesselman, J. Transduction Mechanisms in the Myogenic Response of Blood Vessels / J.Wesselman // *Amsterdam: PrintPartners Ipskamp.* – 1997. – P.1-146
114. Zweifach, J. Local regulation blood flow. – 1970. – P.230.

ГЛАВА 2

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ

2.1. Множественность факторов эндотелийзависимой регуляции тонуса сосудов

Регуляция величины артериального давления и потока крови осуществляется благодаря интегральному взаимодействию рефлекторного, гуморального и локального механизмов регуляции тонуса сосудов. Одним из локальных механизмов регуляции сосудистого тонуса является эндотелийзависимая регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток артериальных сосудов. В основе этой регуляции лежит способность эндотелиоцитов синтезировать и высвобождать большое количество разнообразных соединений, обладающих вазоактивными свойствами.

Монооксид азота. Для модуляции тонуса гладкомышечных клеток сосудов эндотелиоциты, выстилающие все кровеносные сосуды, могут высвобождать как дилататоры, так и констрикторы. Дилатация, зависящая от эндотелия, опосредуется несколькими факторами, включая оксид азота (NO) (Furchgott и Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1988), простагландин (Moncada et al., 1976) и эндотелий гиперполяризующий фактор (EDHF) (Busse et al., 2002).

Молекула оксида азота (NO) не имеет заряда, характеризуется небольшими размерами, высокой проницаемостью во внутри- и внеклеточных средах. Оксид азота – газообразное соединение с периодом полужизни от 3 до 5 секунд (от 0,1 сек. в миокарде до 6-30 сек. в физиологическом растворе) [5]. Наличие неспаренного электрона на внешней орбитали молекулы оксида азота обеспечивает ее высокую реакционную способность. Взаимодействие оксида азота с гем- и тиолсодержащими соединениями в значительной степени увеличивает время стабилизации NO [128, 129]. В процессах образования монооксида азота ключевая роль принадлежит ферменту NO-синтазе, однако в условиях гипоксии оксид азота может быть образован в результате окислительно-восстановительной реакции нитрит-редуктазы [6]. Субстратом NO-синтазной реакции является аминокислота L-аргинин; конечными продуктами этой реакции, в зависимости от соотношения концентрации ко-факторов (флавинаденин-нуклеотида, флавинмононуклеотида, тетрагидробтоптерина) и косубстратов (O_2 и никотинадениннуклеотиддифосфат) NO-синтазы, могут быть оксид азота и L-цитрулин, но и пероксинитрит, нитриты, супероксид-анион и др.

Считается, что физиологически активными депо NO являются динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы [1, 2].

Активность NO-синтазы зависит от внутриклеточного содержания L-аргинина, активности Na^+ - транспортных систем аминокислот, интенсивности протеолиза белков и переаминирования L-цитрулина, а также от внутриклеточной концентрации тетрагидробтоптерина, поскольку это вещество способствует стабилизации комплекса эндотелиоцитарной NO-синтазы в активной димерной форме [7]. Действие различных агонистов - брадикинина, катехоламинов, вазопрессина, гистамина, субстанции P, веществ тромбоцитарного происхождения (серотонина, АДФ), факторов свертывания крови (тромбина), активаторов мускариновых холинорецепторов (ацетилхолина) - может значительно увеличивать активность эндотелиальной NO-синтазы [129, 175]. Образовавшийся в ходе ферментативной реакции монооксид азота диффундирует к сосудистым гладкомышечным клеткам, связывается с атомом железа гема в активном центре растворимой гуанилатциклазы и активирует ее. Помимо монооксида азота, активацию растворимой гуанилатциклазы в различных условиях могут также вызывать активные формы кислорода, окись углерода CO, провоспалительные цитокины и др. [61, 75]. Активированная растворимая гуанилатциклаза превращает ГТФ в ц-ГМФ. ц-ГМФ фосфорилирует ц-ГМФ-зависимую протеинкиназу, что приводит к снижению концентрации внутриклеточного кальция. ц-ГМФ изменяет также Na^+/Ca^{2+} обмен в сосудистых гладкомышечных клетках, функционирование ц-ГМФ-зависимых ионных каналов, ингибирует активность фосфодиэстеразы [52, 176, 100].

Действие монооксида азота может также осуществляться через механизмы, не связанные с активацией растворимой гуанилатциклазы. NO способен активировать АДФ-рибозил-трансферазу, что вызывает рибозилирование цитозольного фермента глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и снижение его активности. В результате нарушаются процессы аэробного гликолиза на стадии образования 1,3-дифосфоглицерата и уменьшается образование АТФ [14, 50]. Наряду с этим, монооксид азота и/или пероксинитрит приводят к ингибированию активности митохондриального электронно-транспортного комплекса I и II, аконитазы, АТФ-синтазы и цитохромоксидазы [26, 137]. Считается, что только значительные концентрации оксида азота или пероксинитрита вызывают снижение тонуса кровеносных сосудов вследствие необратимого нарушения образования АТФ в митохондриях гладкомышечных клеток.

Появление блокаторов NO-синтазы позволило детально изучить *in vitro* и *in vivo* роль NO в регуляции сосудистого тонуса [135]. Стало очевидно, что *in vivo* NO постоянно высвобождается из эндотелия, а также его образование увеличивается в ответ на стимуляцию эндотелиальной клетки веществами, циркулирующими в крови, или в результате изменения напряжения сдвига, возникающего на поверхности эндотелия [28].

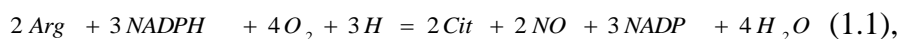
В 1980 г. R. Furchgott и J. Zavadzki [72] впервые обнаружили, что в осуществлении расслабления изолированных артерий, происходящего под воздействием ацетилхолина, обязательно необходим интактный эндотелий. Данное вещество, высвобождающееся из эндотелиоцитов как в просвет сосуда, так и по направлению к гладкомышечным клеткам, получило название эндотелиального фактора релаксации, идентифицированного впоследствии как монооксид азота [135].

Направление биологической эволюции, как известно, определяются физико-химическими и биологическими факторами. Эволюция биохимических систем, в том числе и NO-синтазных и нитритредуктазных, начиналась с простых соединений, которые входили в состав первобытной атмосферы и гидросферы. Анализ NO-синтазных реакций показывает, что в ходе этих реакций из гуанидинового азота (NH₂-группа) L-аргинина через промежуточное соединение – гидроксил –L-аргинин (ОН-L-аргинин) – образуется NO (рис. 2.1).

Выделены химические группировки, которые участвуют в реакции. Согласно существующим представлениям одним из наиболее важных этапов в NO-синтазной реакции является окисление гуанидинового азота при участии супероксидных анион-радикалов, образующихся на домене P-450 NO-синтазы. Затем гидроксилированная форма L-аргинина превращается в L-цитруллин с одновременным образованием NO, который затем в присутствии кислорода и его активированных форм превращается в ионы NO₂ и NO₃.

В клетках млекопитающих NO синтезируется из L-аргинина с помощью ферментов NO-синтаз.

Схематично реакцию синтеза NO можно представить в виде уравнения (1.1):



где Arg – аргинин; Cit – цитруллин.

Катализируют эту реакцию семейство ферментов, называемых NO-синтазами (NOS) [25].

Каждый мономер NOS состоит из двух доменов: оксигеназного и редуктазного. Каждая подъединица скрепляется цинковым ионом, который связан двумя цистеинами от каждого оксигеназного домена. Кальмодулин (CaM) связывает области доменов между собой (рис. 2.2). Редуктазный домен поставляет электроны для NOS реакции, которая протекает в оксигенозном домене. Домен редуктазы состоит из двух редокс-активных простетических групп, флавин аденин динуклеотид (flavin adenine dinucleotide) (FAD) и флавин монопнуклеотид (flavin mononucleotide (FMN)).

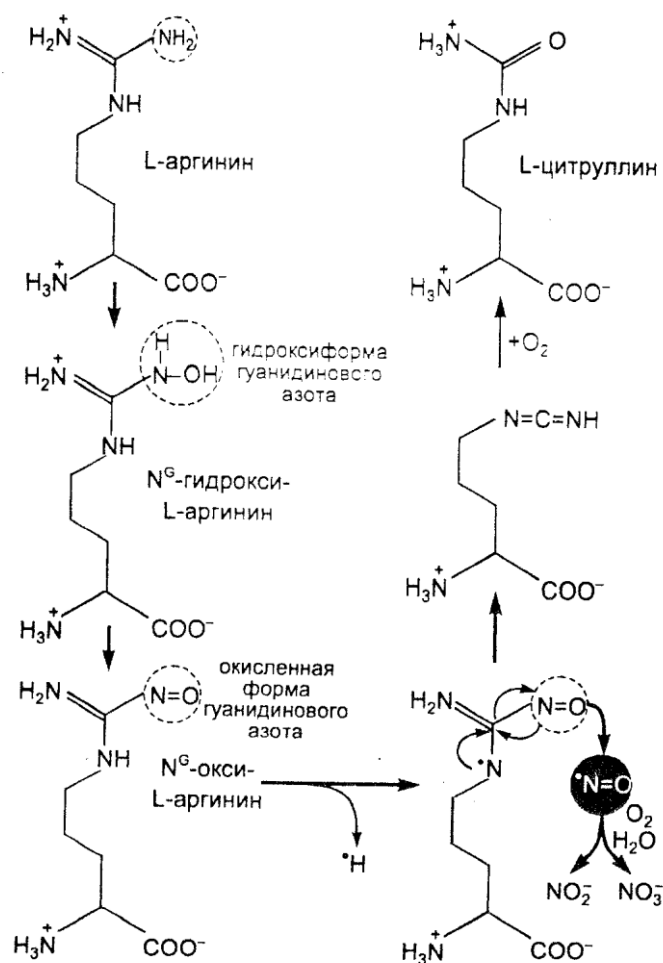


Рисунок 2.1. Образования оксида азота в организме млекопитающих при участии NO-синтазы

Никотинамид аденин динуклеотид (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)) передает электрон FAD, который передает электрон на FMN. FMN передает электрон на гемсодержащую группу (Fe) (рис. 2.2, 2.3) оксигеназного домена на противоположной подъединице. Оксигеназный домен содержит 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (H₄B) (рис. 2.2, 2.3) и уже упомянутую гемсодержащую группу. Это также редокс-активные группы. Помимо гемма и ВН₄, оксигеназный домен связывает L-аргинин (Arg) основания, который принимает участие в NO-синтазной реакции.

Нейрональная NO-синтаза (NOS-1) впервые была обнаружена в нервной ткани. Кроме этого NOS-1 экспрессируется в кардиомиоцитах, скелетных мышцах, эпителии бронхов и трахеи. Нейрональная NO-синтаза – конституциональный фермент и его экспрессия в значительной степени регулируется концентрацией ионов Ca²⁺ в клетке.

NOS-1 принимает участие в формировании механизмов памяти, модулирует болевое раздражение, фермент ответственен за координационные связи между нервной активностью и сосудистым тонусом. Повышение агрессивности и сексуальности у животных наблюдается при ингибировании NOS-1, а также увеличение частоты небольших церебральных инфарктов.

Второй тип – NOS-2 (iNOS) – индуцибельный фермент, уровень его активности не зависит от концентрации ионов кальция в клетке. Основными индукторами NOS-2 являются макрофаги, однако индукция может быть вызвана воспалительными цитокинами, некоторыми компонентами клеточной стенки грамположительных бактерий, эндотоксинами, механическим повреждением сосудистой стенки, беременностью.

Индукцибельная NO-синтаза способна синтезировать цитотоксические уровни монооксида азота. Гиперпродукция NO, продуцируемая iNOS, как правило, приводит к гипотонии сосудов, а также к развитию септического шока. Исследования последних лет показали, что iNOS – конституциональный фермент. Этот фермент обнаружили в некоторых фетальных тканях, в эпителии бронхов человека, почках крыс.

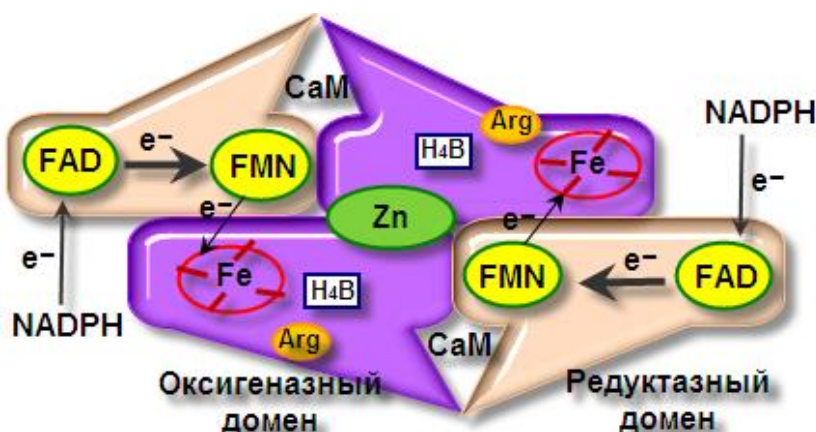


Рисунок 2.2. Структура димера NO-синтазы

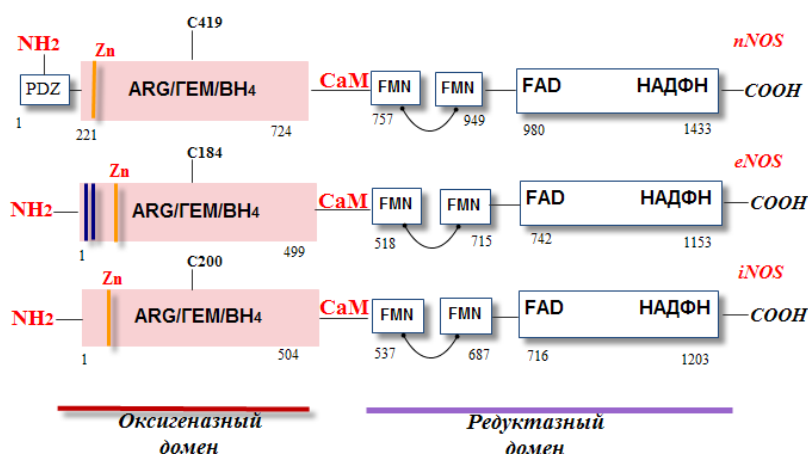


Рисунок 2.3. Структура димера eNOS, iNOS, nNOS

Экспрессия iNOS в сердце происходит в норме и при патологии в макрофагах, фибробластах, эндотелиоцитах коронарных сосудов и эндокарда, гладкомышечных клетках коронарных сосудов, во взрослых и неонатальных кардиомиоцитах [97, 122]. Выявлен факт участия iNOS в кардиомиогенезе – ее экспрессия выявлена уже в эмбриональном периоде [130, 134].

В кардиомиоцитах iNOS локализована вдоль сократительных волокон, в плазматических мембранах, включая T-тубулы, ядерную оболочку, митохондрии и комплекс Гольджи. Ее расположение вблизи митохондрий и сократительных волокон позволяет предположить участие NO, продуцируемого iNOS, в регуляции энергетических процессов и сокращении сердца [97]. Экспериментальная блокада NOS-2 приводит к повышению чувствительности организма к инфекции, ослаблению, но не полной утрате гипотензивного эффекта эндотоксина, нарушению кардиопротекции. Было показано, что цитокин-индуцированная экспрессия и активность эндогенного iNOS может играть ключевую роль в поддержании нормальной функции эндотелия. Таким образом, подавление экспрессии индуцибельного монооксида азота или ограничение клеточного

субстрата, что наблюдается у пациентов с атеросклерозом, может вносить существенный вклад в дисфункцию эндотелия во время окислительного стресса [87].

К настоящему времени накоплен большой материал о механизме регуляции активности iNOS в макрофагах и гладкомышечных клетках [49]. Так при интермиттирующей гипоксии возникает небольшая активация генов ответственных за синтез iNOS с последующим депонированием NO. Действие различных стрессоров приводят к образованию iNOS. Наибольшая концентрация iNOS наблюдается через 6 – 12 часов после начала действия агента. Гиперпродукция NO, продуцируемого iNOS, оказывает негативное влияние на аконитазу, гуанилатциклазу, компоненты дыхательной цепи митохондрий, рибонуклеотидредуктазу. Гиперпродукция оксида азота, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой может быть рассмотрена в качестве патогенетического механизма нарушения синтеза ДНК и энергетического обмена [140, 143]. В организме эта способность оксида азота используется для уничтожения опухолевых клеток макрофагами, которые не только сами производят NO, но и секретируют фактор некроза опухолей, вызывающий индукцию NOS в опухолевых и других клетках. Активация iNOS имеет место при болезнях иммунной системы, сердечно-сосудистых и злокачественных заболеваниях, остром и хроническом воспалении. При воспалении, особенно при септическом шоке, происходит увеличение уровня пептида, ассоциированного с геном кальцитонина. Этот пептид представляет собой цАМФ-зависимый сосудорасширяющий агент. При эндотоксическом шоке активация iNOS и избыточная продукция NO чреваты немедленными тяжелыми последствиями. Гиперпродукция монооксида азота обуславливается экспрессией iNOS под влиянием цитокинов опосредована активирующимся ядерным фактором транскрипции NF-kB и, в некоторых случаях, активацией eNOS. При избытке NO происходит инактивация железосодержащих белков - дыхательных ферментов митохондрий, что ингибирует рост и деление клеток. Избыток NO в сердечно-сосудистой системе повышает проницаемость сосудов, следствием чего является развитие отеков тканей, вызывает кардиотоксическое действие, провоцирует стойкую генерализованную вазодилатацию и выраженное падение АД [105].

NOS-3 – мембраносвязанный белок, активность которого зависит от мембранной локализации. Чаще всего фермент связывается с кавеолами. Кавеола представляет собой инвагинацию плазматической мембраны. Она характеризуется наличием большого количества холестерина, сфинголипидов, сайтов для связывания сигнальных белков (G-белков), инозитол-3-фосфата, протеинкиназ и трансмембранного белка кавеолина. Этот белок способен формировать белковые «подмости» для органелл, взаимодействовать с цитоскелетом. Мембрана эндотелиоцитов – преимущественное место локализации кавеол. Однако они обнаружены в кардиомиоцитах, адипоцитах и некоторых других клетках [52, 57]. Основные функции монооксида азота эндотелиального происхождения следующие: (1) поддержание базального тонуса кровеносных, в том числе и коронарных сосудов; (2) предупреждение адгезии и агрегации тромбоцитов к эндотелию; (3) ингибирование экспрессии молекул адгезии на эндотелиоцитах; (4) влияние на характер взаимодействий между эндотелиальными клетками и лейкоцитами; (4) регуляция пролиферации и миграции сосудистых гладкомышечных клеток; (5) подавление апоптоза эндотелиоцитов и сосудистых гладкомышечных клеток; (6) поддержание про- и антиоксидантного равновесия в крови и сосудистой стенке [10, 34, 67].

Простациклин - это второй известный продукт эндотелиального происхождения, который может вызывать гиперполяризацию и расслабление сосудистой гладкой мышцы. Расслабление гладкомышечных клеток происходит благодаря увеличению внутриклеточной концентрации ц-АМФ [17]. Кроме того, релаксирующий эффект простациклина может усиливаться оксидом азота. Это возможно благодаря тому, что оксид азота может действовать в качестве ингибитора фосфодиэстеразы – фермента, разрушающего ц-АМФ [100]. ц-АМФ также способен открывать АТФ-чувствительные

калиевые каналы в мембране гладких миоцитов (K_{ATP}), в результате чего увеличивается выход ионов калия из клетки и возникает гиперполяризация [62, 100].

В 1984 г. Болтон и др. впервые показали, что стимуляция эндотелия сосудов вызывает гиперполяризацию и расслабление гладкой мышцы мезентериальной артерии морской свинки [24]. В тоже время, эндотелиальный NO способен гиперполяризовать гладкую мышцу лишь в некоторых сосудах. Позже стало очевидным, что подобную гиперполяризацию вызывает и простаглицлин [151]. Однако то обстоятельство, что в условиях блокады синтеза NO и простаглицлинов стимуляция эндотелия многих сосудов все же способна вызвать гиперполяризацию сосудистых гладких мышц, послужило основанием назвать это соединение неизвестной природы эндотелиальным фактором гиперполяризации (EDHF).

В соответствии с этим NO, эйкозаноиды и эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF) были идентифицированы как главные релаксирующие факторы эндотелиального происхождения. Простаглицлин отвечает всем требованиям, предъявляемым к EDHF. Однако в большинстве случаев эндотелийзависимая гиперполяризация сосудистой гладкой мышцы является устойчивой к действию блокаторов синтеза простаглицлинов.

Наблюдения, выполненные на интактных животных, подтвердили важную роль EDHF в регуляции диаметра маленьких сосудов *in vitro* [88]. Кроме того, было показано, что, по крайней мере, в некоторых артериях NO может подавлять доступность и эффективность EDHF [103].

Таким образом, нарушение биодоступности NO, которое наблюдается при различных заболеваниях, выявляет действие EDHF. Главная роль EDHF заключается в том, чтобы компенсировать ослабление влияния NO [54, 173].

К возможным веществам, действующим как **эндотелиальный гиперполяризующий фактор** или факторы (EDHF) и вызывающим гиперполяризацию гладкомышечных клеток, в настоящее время относят производные цитохром P-450 монооксигеназы - эпоксиэйкозотриеновые кислоты (EET) [43], ионы калия [53], каннабиноиды [66, 141, 146], пероксид водорода [35, 91] и электрическое сопряжение эндотелиальных и гладкомышечных клеток при помощи миоэндотелиальных плотных контактов (gap junctions) [121, 178].

Эпоксиэйкозотриеновые кислоты (11-12 EET). EET-зависимый EDHF вносит вклад в развитие эндотелийзависимой вазодилатации, который может обеспечить полное расслабление и является чувствительным к коктейлю харибдотоксин+апамин.[30, 53, 63, 84]. Установлена роль эндотелиальной цитохром P450 монооксигеназы в модуляции эндотелийзависимой гиперполяризации в коронарных сосудах различных видов животных. Первым крупным достижением было осуществление синтеза и выяснение свойств специфического антагониста эпоксиэйкозотриеновой кислоты 14-15-эпоксиэйкозо-5Z-моноеновой кислоты (14-15-EEZE) и его метилсульфонимидного производного. Этот антагонист ингибировал эндотелийзависимое расслабление и устойчивую к ингибиторам NO-синтазы и циклооксигеназы гиперполяризацию. Мишень (рецептор, канал или фермент) действия 14-15-EEZE все еще неизвестна (эндотелий или гладкомышечная клетка). Более того, уже выявлено влияние 14-15-EEZE на SK_{Ca} и IK_{Ca} -каналы эндотелиоцитов. Таким образом, это соединение может стать инструментом для точной идентификации роли EET в EDHF-опосредуемых ответах.

Тот факт, что в условиях ингибирования NO-синтазы и циклооксигеназы наблюдается подавляемое блокатором цитохром P450 монооксигеназы ацетилхолинзависимое расслабление сосудов *m.cremaster* хомячка, позволяет предположить, что в данном сосудистом ложе имеет место высвобождение EET. Подобно этому, в артериолах *m.gracilis* самок мышей с отсутствующими генами NO-синтазы shear stress также вызывает высвобождение продукта цитохрома P450 эпоксигеназы. Этот факт подтверждается тем, что циклическое растяжение и напряжение сдвига на эндотелиоцитах

(shear stress) увеличивают экспрессию и активацию цитохром P450 2C в эндотелиальных клетках [70]. В исследованиях, проведенных с использованием коронарных артерий различных видов животных, было показано, что в этих сосудах в роли EDHF выступает EETs. Они вызывают гиперполяризацию гладкомышечных клеток, благодаря активации калиевых каналов большой проводимости, расположенных в их мембране [182].

Дополнительная роль EET заключается в том, что он вызывает гиперполяризацию тромбоцитов, а в мозговом кровообращении производное астрочитов 8,9-EET оказывает ангиогенный эффект и способствует пролиферации эндотелиоцитов [30].

Ионы K^+ . Впервые на препаратах мезентериальной и печеночной артерий было показано, что через эндотелиальные калиевые каналы ионы калия выходят и накапливаются во внеклеточном пространстве, тем самым вызывая гиперполяризацию окружающих гладких мышц [20, 89, 90]. Этот механизм также наблюдается при EDHF-опосредуемом ответе печеночной артерии крысы и людей, так же, как и в маленьких коронарных артериях свиньи [36]. В гладкомышечных клетках артерий крысы имеются две мишени, на которые действуют ионы K^+ , высвободившиеся из эндотелиоцитов, - Kir-каналы и Na^+/K^+ АТФ-аза. Это влияние ионов K^+ на мембранный потенциал вызывает гиперполяризацию и расслабление гладкомышечных клеток [45, 46]. Подобный механизм может объяснить тот факт, что ионы калия действуют как EDHF и в деполяризованных тканях устраняют EDHF-опосредуемый ответ [68].

Подобно натрию, калий является вазоактивным ионом. Например, когда раствор хлористого калия вводят в артерию, то это сопровождается увеличением кровотока в области кровоснабжения этой артерией. Калий является главным внутриклеточным катионом, и, как уже было показано, теряется клетками скелетной мышцы во время физической нагрузки, затем пересекает внеклеточное пространство и вызывает локальную дилатацию артериол [47, 80, 81]. Если калиевые ионы играют роль как локальный метаболический регулятор кровотока в скелетной мышце, то, вероятно, они также могут быть вовлечены в регуляцию коронарного кровотока. В 1936 году было продемонстрировано, что ионы калия расслабляют изолированные сосудистые полоски. Это было подтверждено и более поздними исследованиями [109].

Вызываемая ионами калия вазодилатация [144] возникает в результате гиперполяризации сосудистых гладкомышечных клеток, развивающейся вследствие стимуляции электрогенного Na-K-насоса и /или активации внутренне выпрямляющих Kir-калиевых каналов [42]. В скелетных мышцах и мозге увеличение калием кровотока является необходимым для обеспечения возрастания метаболической потребности ткани. Ионы калия также высвобождаются эндотелиальными клетками в ответ на действие на них нейрогуморальных медиаторов и физических сил (подобно shear stress) и, будучи компонентом EDHF опосредуемого ответа, вносят вклад в эндотелийзависимое расслабление [40, 41, 171]. Увеличение потребления калия с пищей может приводить к уменьшению артериального давления у пациентов с нормальным артериальным давлением и у гипертоников. Однако, в отличие от ограничения NaCl, ответ на добавление калия к пище наступает медленно, в течение 4-х недель. Применение подобной добавки приводит к уменьшению потребности в гипотензивных средствах [82]. Больные с «соль-зависимой» гипертензией отвечают особенно хорошо, возможно, частично, потому, что употребление калия приводит к увеличению экскреции с мочой хлористого натрия. Добавление калия в пищу даже может приводить к снижению органных системных осложнений артериальной гипертензии (например, инсульта) [82].

Пероксид водорода. В различных сообщениях пероксид водорода представлен как вазоконстриктор [86] либо вазодилататор [59], либо как вещество, сочетающее в себе оба свойства [44, 118]. Кроме того, был показан различный эффект перекиси водорода эндогенного и экзогенного происхождения [158]. Подобные различия, по-видимому, зависят от следующего: во-первых, выполнялись ли эксперименты in vivo или in vitro; во-вторых, исследовали ли проводниковый или резистивный сосуды; в-третьих, эксперимент

проводился в естественных условиях или в условиях фармакологического увеличения тонуса. Так, в ответ на введение перекиси водорода изолированная хвостовая артериола мышцы суживается [147], в то время как мезентериальная артериола расширяется [158]. В большинстве сообщений, касающихся влияния перекиси водорода на тонус коронарных сосудов, указывается, что пероксид водорода расслабляет артериолярную и артериальную сосудистую гладкую мышцу [21, 115]. Было показано, что пероксид водорода является EDHF [91] и медиатором потокиндуцируемой дилатации [152]. Таким образом, считается, что эндотелий продуцирует пероксид водорода как вещество, расслабляющее сосудистую гладкую мышцу. Также было установлено, что пероксид водорода опосредует реактивную гиперемия [104, 165], а в сочетании с монооксидом азота и аденозином оказывает влияние на ауторегуляцию коронарного потока [92]. Р.А. Rogers et al. (2006) показали, что пероксид водорода увеличивает коронарный кровоток как *in vivo*, так и *in vitro*, оказывает свое влияние на тонус гладкой мышцы посредством активации чувствительных к 4-аминопиридину калиевых каналов. Одним из механизмов действия перекиси водорода на сократительную активность гладкой мышцы является окисление редокс-чувствительных белковых SH-групп [58, 79].

В пилотных работах при изучении влияния реактивных форм кислорода на тонус коронарных сосудов, как правило, описывалось негативное влияние активных форм кислорода (АФК). Например, существует много исследований, в которых описывается, что АФК повреждают эндотелиоциты коронарных сосудов, тем самым препятствуют передаче сигналов NO [12]. АФК также могут ухудшать функции ионных каналов, расположенных в гладкомышечных клетках сосудов сердца. Известно, что пероксинитрит ингибирует активность BK_{Ca} -канала гладкомышечных клеток коронарных артериол человека [138], супероксид анион снижает функцию K_v -канал гладких миоцитов коронарных артерий крыс [114]. Однако, важно отметить, что количество и тип АФК являются важными сигнальными молекулами для нормальной функции коронарного сосуда в здоровом сердце [27]. В частности, особый интерес вызывает H_2O_2 , как активатор калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках коронарных сосудов. В коронарных миоцитах H_2O_2 рассматривают как медиатор коронарной вазодилатации, поскольку исследования показывают, что H_2O_2 может быть рассмотрен как кандидат на коронарный метаболический вазодилататор и являться эндотелиальным гиперполяризующим фактором [58]. Есть эндотелийзависимые и независимые эффекты H_2O_2 при вазодилатации коронарных артериол; активация именно BK_{Ca} , но не K_{ATP} -каналов оказывает эффект на гладкомышечные клетки венечных сосудов [168]. В коронарных артериолах человека вазодилатация опосредована действием от H_2O_2 на BK_{Ca} -каналы через редокс-чувствительную димеризацию протеинкиназы G [183]. Тетраэтиламмоний-чувствительные калиевые каналы (BK_{Ca} или K_v) в коронарных сосудах являются редокс-чувствительными мишенями в ответ на действие эндогенного H_2O_2 во время ишемии реперфузионного повреждения, обладая кардиозащитным эффектом [33]. В сердце собаки эритропоэтин усиливает H_2O_2 - и BK_{Ca} -опосредованную дилатацию коронарных коллатеральных артериол при ишемии [65]. Редокс-чувствительные K_v (но не BK_{Ca}) каналы опосредуют индуцированную H_2O_2 вазодилатацию коронарных артериол у собак и в сердце собаки *in vivo* [79]. Также сообщалось, что тетраэтиламмоний-чувствительные калиевые каналы (BK_{Ca} или K_v) в микроциркуляторном русле сердца собак являются мишенями эндогенного H_2O_2 в индуцированной стимуляцией метаболической коронарной вазодилатации [181]. В гладкомышечных клетках коронарных сосудов собаки индуцированная H_2O_2 активация BK_{Ca} - и K_v -каналов были продемонстрированы с использованием методов патч-зажима [150]. В коронарных миоцитах свиньи, продукты метаболизма арахидоновой кислоты опосредуют индуцированную H_2O_2 стимуляцию BK_{Ca} -каналов [21, 22]. В то время как несколько типов калиевых каналов активируются H_2O_2 , K_v -каналы могут играть наиболее важную роль в индуцированной H_2O_2 коронарной метаболической вазодилатации по четырем

причинам. Во-первых, эксперименты с селективным ингибитором K_v -канала 4-аминопиридином показывают, что эндогенный H_2O_2 , полученный из миокарда, представляет собой сигнал обратной связи (разомкнутый контур) в коронарной метаболической вазодилатации *in vivo* у собак [93]. Во-вторых, 4-аминопиридин-чувствительные K_v -каналы способствуют регуляции коронарного кровотока в покое и во время тренировок на беговой дорожке у свиней, сопровождающейся увеличением потребления миокардом кислорода [23]. Таким образом, существует линейная зависимость между коронарным кровотоком и сердечным метаболизмом (оцененная как продукт среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений) у мышей дикого типа; связь между потреблением и потребленным миокардом кислородом заметно снижена у мышей с выбитыми генами $K_v1.5$.

Анандамид. Рэндал и соавторы в 1996 году предположили, что EDHF представляет собой производное арахидоновой кислоты анандамид, который взаимодействует каннабиноидными рецепторами, расположенными на гладкомышечных клетках [16]. Применение блокаторов каннабиноидных рецепторов предупреждает эффект эндотелиального фактора гиперполяризации. Кроме того, его эффект уменьшался при увеличении внеклеточной концентрации ионов калия, препятствующей появлению гиперполяризации. Однако в этой работе не было прямо продемонстрировано, что анандамид вызывает гиперполяризацию гладкомышечных клеток вследствие активации калиевых каналов [16].

Межклеточные контакты. Возможность прямого внутриклеточного распространения широко обсуждается в литературе, а также служит подтверждением существования миоэндотелиального плотного контакта (gap junctions) [76]. Более того, пептидный ингибитор плотных контактов подавлял, но не устранял действие EDHF на гладкую мышцу [39, 99].

Благодаря использованию ингибиторов появились доказательства вовлечения миоэндотелиальных плотных контактов почечных сосудов в механизм действия EDHF *in vivo* [48]. Это исследование показало, что пептидные ингибиторы не только блокируют вызываемое ацетилхолином, обусловленное EDHF увеличение кровотока, но также и снижают базальный кровоток в этом сосудистом ложе.

В последние несколько лет появились данные, касающиеся роли межклеточных контактов в распространении гиперполяризации. Плотные контакты между эндотелиальными клетками облегчают продольное распространение вызванной агонистами как гиперполяризации, так и расслабления, в то время как плотные контакты между гладкомышечными клетками, возможно, благодаря диффузии инозитол-3-фосфата или ионов Ca^{2+} , координируют базальный тонус артериоларных сегментов. Эти соединения, характеризующиеся пенталаминарной структурой, находятся между прилегающими к эндотелию гладкомышечными клетками, встречаются в кровеносных сосудах (мезентериальная артерия крысы), в которых показано эндотелийзависимое расслабление (гиперполяризация), устойчивое к комбинации ингибиторов циклооксигеназы и NO-синтазы. Напротив, в кровеносных сосудах (бедренная артерия крысы), в которых подобный ответ не наблюдается, миоэндотелиальные плотные контакты отсутствуют (рис. 2.4).

Дальнейшее подтверждение обязательного участия миоэндотелиальных плотных контактов в EDHF-опосредуемом ответе, наблюдающемся в мезентериальной артерии крысы, получено при наблюдении вызываемой ацетилхолином гиперполяризации эндотелиальных клеток как мезентериальной, так и бедренной артерии, а гиперполяризация гладкомышечных клеток - только в мезентериальной артерии. Таким образом, регуляция экспрессии миоэндотелиальных плотных контактов может объяснить компенсаторное возрастание роли EDHF-опосредуемого ответа в хвостовой артерии гипертензивных крыс. Является ли плотный контакт местом преимущественного переноса электрических зарядов или молекул-посредников (EDHF), все еще остается нерешенным

вопросом. Однако образование циклического АМФ, несомненно, вовлечено в данный ответ благодаря вызываемому им увеличению проницаемости миоэндотелиальных и гомоклеточных плотных контактов.

Физиологическая и патофизиологическая роль EDHF-опосредуемых ответов. Два главных факта указывают на роль EDHF-опосредуемого ответа в регуляции сосудистой системы. Во-первых, у анестезированных крыс блокада NO-синтазы увеличивает базальную проводимость в мезентериальном сосудистом ложе и сосудах нижней половины туловища. Сочетанное локальное применение харибдотоксина+апамина не оказывало влияние ни в одном сосудистом ложе. Однако вызываемое ацетилхолином увеличение проводимости было чувствительно как к блокатору NO-синтазы, так и к комбинации харибдотоксина+апамина (но не ибериотоксину). Это указывает на то, что EDHF-опосредуемый ответ вносит небольшой вклад в базальную проводимость [56]. Во-вторых, в изолированных мезентериальных артериях крысы, находящихся в условиях повышенной экспрессии SK_{Ca} (X3), чувствительность к фенилэфрину снижается, по сравнению с животными с нормальным содержанием калиевых каналов. Этот эффект блокировался комбинацией харибдотоксина+апамина. У этих животных диаметр кровеносных сосудов увеличивался, а плотность артерий становилась больше. Подавление повышенной экспрессии калиевых каналов доксициклином приводит к увеличению кровяного давления и выраженному снижению абсолютного значения мембранного потенциала гладкомышечных клеток [56].

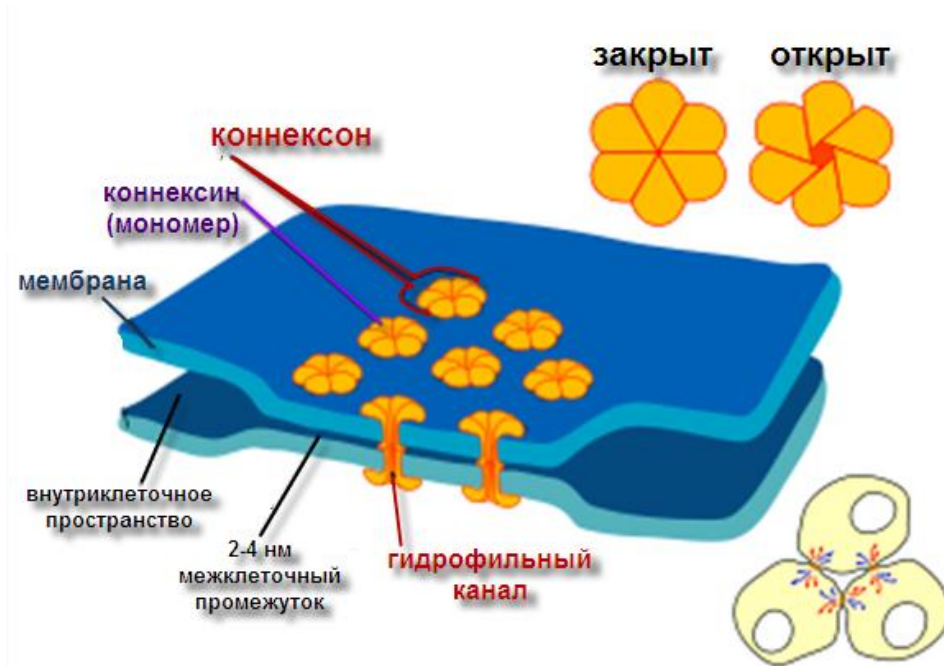


Рисунок 2.4. Структура плотных контактов

Описаны два пути ответов EDHF. Классический путь EDHF включает открытие промежуточных кальцием активируемых калиевых каналов (IK_{Ca}) и калиевых каналов малой проводимости (SK_{Ca}), расположенных в эндотелиоцитах с последующей гиперполяризацией и вазорелаксацией гладкомышечных клеток сосудов. Либо через активацию нисходящего сигнального пути [154] или миоэндотелиальных контактов [74]. Иной путь активации EDHF не связано с гиперполяризацией эндотелия, но включает высвобождение эндотелиальных факторов, такие как NO, нитроксил (HNO) и эпоксиэйкосатриеновой кислоты (EET). Чтобы вызвать гиперполяризацию гладкомышечных клеток сосудов эти вещества действуют на калиевые каналы, расположенные в гладкомышечных клетках [174]. Например, в артерии брыжейки крыс,

эндотелийзависимая релаксация опосредуется NO, классический путь EDHF, но существует также роль и неклассического пути EDHF [11]. Относительный вклад каждого пути могут изменяться при сосудистых заболеваниях [125].

При различных заболеваниях сосудов наблюдается снижение EDHF-опосредуемых ответов. Эксперименты на изолированных артериях человека, полученных из биоптатов миометрия, показали, что у беременных женщин с преэклампсией имеются специфические нарушения EDHF-опосредуемой вазодилатации [110]. Более того, существуют доказательства улучшения EDHF-опосредуемого ответа благодаря введению крысам с удаленными яичниками эстрогенов и старым крысам - блокаторов ангиотензинпревращающего фермента.

Подводя итог приведенным в данном разделе фактам, можно заключить, что не так давно о природе EDHF существовало столько гипотез, сколько ученых работали в этом направлении. В настоящее время обнаружен универсальный механизм, который позволяет объяснить большинство ответов, являющихся следствием действия EDHF и наблюдающихся во всех изучаемых кровеносных сосудах и видах животных. Описан феномен эндотелийзависимой гиперполяризации, согласно которому, во-первых, в результате увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в эндотелиоцитах активируются SK_{Ca} и/или IK_{Ca} каналы; во-вторых, в результате этого высвобождаются эндотелиальные вазорелаксирующие субстанции, вызывающие гиперполяризацию гладкомышечных клеток. Через миоэндотелиальные плотные контакты гиперполяризация электротонически распространяется на прилегающие гладкомышечные клетки, которые формируют функциональный синцитий. Кроме того, выходящие через открытые SK_{Ca} и IK_{Ca} каналы эндотелиоцитов ионы K^+ могут вызывать гиперполяризацию прилегающих гладкомышечных клеток артериальных сосудов, активируя Kir -каналы и/или Na^+/K^+ АТФ-азу. Эти механизмы могут иметь место одновременно, последовательно и действовать энергично. Соотношение этих механизмов будет зависеть от разных условий, которые включают в себя состояние гладкомышечных клеток, плотность миоэндотелиальных контактов, а также уровень экспрессии изоформ цитохромом P450 монооксигеназы, Kir и Na^+/K^+ АТФ-азы.

2.2. Механизмы регуляции монооксида азота

Недавние исследования показали, что экспрессия цитоглобина, индуцированного эндотелиальными клетками, способствует модуляции оксида азота в гладкомышечных клетках сосудов [60].

Цитоглобин представляет собой широко экспрессированный белок гема, который связывает кислород, окись углерода и оксид азота. Lilly B. с соавторами показали, что снижение концентрации цитоглобина в гладкомышечных клетках артериальных сосудов приводит к увеличению клеточного оксида азота. Ученые пришли к выводу о том, что монооксид азота, продуцируемый эндотелиоцитами, увеличивает способность гладкомышечных клеток метаболизировать оксид азота путем повышения активности цитоглобина [60].

Одной из молекулярных мишеней для оксида азота могут являться белки, содержащие сульфгидрильные группы. Оксид азота может быть рассмотрен, как эффективный катализатор образования ковалентной связи между двумя атомами серы (дисульфидных мостиков). Благодаря взаимодействию с сульфидными группами, оксид азота может регулировать биосинтез белка в клетке [128].

Эффект монооксида азота частично опосредуется BK_{Ca} -каналами гладкомышечных клеток сосудов. Существует две гипотезы, объясняющие эффект монооксида азота на BK_{Ca} -каналы. Одна из них связана с активацией оксидом азота растворимой гуанилатциклазы с последующим увеличением производства цГМФ и активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы. Последняя в свою очередь увеличивает активность BK_{Ca} -каналов. Другая гипотеза утверждает, что монооксид азота активирует BK_{Ca} -каналы

независимо от цГМФ-зависимой протеинкиназы, т.е. предполагается прямое воздействие NO на VCa^{2+} -каналы [15, 69, 127, 142].

Предполагают, что монооксид азота может модулировать активацию АТФ-чувствительных калиевых каналов через увеличение вторичного посредника цГМФ. цГМФ-зависимые протеинкиназы способны фосфорилировать домены K_{ATP} -калиевых каналов, тем самым способствуя кардиопротекции [29, 77]. Мийоши с соавторами [111, 120] продемонстрировали, что монооксид азота повышает активность АТФ-чувствительных калиевых каналов гладкомышечных клеток сосудов. Кроме того, известно о прямой активации митохондриальных K_{ATP} -калиевых каналов экзогенным монооксидом азота. Активацию АТФ-чувствительного калиевого канала рассматривают как потенциальный механизм защиты миокарда в раннем и позднем ишемия-реперфузионном повреждении [13].

Как уже говорилось ранее, пероксинитрит в микромолярных концентрациях снижает тонус коронарных артерий и предотвращает активацию лейкоцитов и их адгезию к эндотелиоцитам [139]. Положительные эффекты, вызванные действием небольших концентраций пероксинитрита, объясняют нитрозилированием тиолсодержащих соединений [166], а также взаимодействием его со спиртовыми группами, в результате чего образуется депо монооксида азота [4]. Взаимодействие монооксида азота с тиолсодержащими соединениями и гемсодержащими протеинами также существенным образом продлевает время существования его молекулы [8], считается, что динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы являются физиологически активными депо NO [1, 3].

Хроническая физическая нагрузка у собаки индуцирует значительное расширение коронарных артерий в ответ на кратковременное введение ацетилхолина. Обнаруженный эффект может объясняться более интенсивной генерацией NO вследствие экспрессии гена eNOS. Возможно, в полный цикл установленного пути регулирования вовлечена система гипофиз – надпочечники как неспецифический механизм долговременной адаптации организма к различного рода стрессорным воздействиям. Во многих работах приводятся свидетельства участия других стероидных гормонов (половых) в регуляции синтеза NO [149].

Описан положительный эффект 17-эстрадиола на уровень образования монооксида азота в головном мозге, почках, сердце и скелетных мышцах морских свинок; показано, что введение небольших доз 17-эстрадиола вызывает у крыс увеличение базального уровня NO [9, 113]. Аналогичный эффект вызывает эстроген посредством усиления экспрессии мРНК eNOS в ЦНС и в клетках эндотелия. Инкубация клеток эндотелия с 17-эстрадиолом в течение 16–24 часов вызывает дозозависимое увеличение содержания мРНК NOS и концентрацию NO в ответ на стимуляцию ацетилхолином. Установлена роль женских половых гормонов в увеличении экспрессии гена NOS 1 и активности фермента NOS в мозговом слое надпочечников у спонтанно гипертензивных крыс [157].

2.3. Основные функции NO в сердечно-сосудистой системе

Из всех известных эндогенных вазодилататоров, NO является мощнейшим. За счет того, что сосуды малого диаметра синтезируют больше NO, чем сосуды крупного диаметра, NO участвует в регуляции периферического сопротивления и регулирует АД [73, 117]. Центральная роль монооксида азота в регуляции тонуса сосудов и поддержания кровяного давления была установлена в конце 1980-х годов с применением фармакологических средств [148], а позже и генной инженерии [94, 106]. Применение ингибиторов NOS вызывало развитие гипертензии и значительно ограничивало приток крови к тканям. У мышей, с отсутствующим геном eNOS, наблюдалось стойкое повышение артериального давления [123, 153]. Вовлеченность артериол скелетной мускулатуры в регуляцию артериального давления, показывает, что нарушение процесса синтеза эндотелиальных факторов способствует росту периферического сопротивления, что повышает уровень АД [83, 108].

Монооксид азота контролирует активацию тромбоцитов, функции митохондрий, перенос ионов, воспаление, ангиогенез и клеточную пролиферацию, другими словами поддерживает гомеостаз в сердечно-сосудистой системе.

NO участвует в контроле частоты сердечных сокращений и сократимости [19, 98, 126], ограничивает кардиологическое ремоделирование после ишемия-реперфузионных повреждений, является важным звеном в предварительном кондиционировании и ишемическом посткондиционировании [38, 95, 96, 131].

Устойчивая генерация NO в кардиомиоцитах и специфическая субклеточная локализация eNOS и nNOS указывают на разные роли этих изоформ в функции сердца [161, 184]. Кроме того, предполагают, что количество биологически активных молекул монооксида азота может регулировать сократимость сердца: более низкие уровни могут способствовать сократимости, тогда как более высокие уровни имеют противоположный эффект [167].

Конститутивные формы монооксида азота оказывают положительное инотропное действие посредством цГМФ – опосредованного ингибирования фосфодиэстеразы 3 типа, что приводит к активации цАМФ-сигнального пути [31, 107]. Кроме того, NO может открывать рианодин-чувствительные кальциевые каналы в кардиомиоцитах путем S-нитрозонирования [155, 180]. Вазодилаторное действие NO, продуцируемого eNOS, в коронарных сосудах, может также способствовать усилению сократимости. Многочисленные исследования моделей ишемия-реперфузионного повреждения продемонстрировали протективную роль NO при ишемии миокарда [31, 102]. Было выявлено, что экзогенный NO и избыточная экспрессия NOS у трансгенных животных являются защитными механизмами при ишемия-реперфузионном повреждении; наоборот, ингибирование NOS или удаление гена, ответственного за синтез NOS усугубляет травму. Интересно, что iNOS также имеет важную защитную роль. NO-cGMP-зависимый сигнальный механизм приводит к открытию митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала (K_{ATP} -канал), тем самым ограничивая поступление ионов кальция в кардиомиоцит [18, 156]. Защитные эффекты NO также были связаны с их способностью ингибировать митохондриальную проницаемость, что предотвращает выделение цитохрома C и апоптоз [64]. К тому же, NO ингибирует комплекс I в электронно-транспортной цепи митохондрий через вторичное образование нитрита и S-нитрозотиолов, тем самым ограничивая образование митохондриальных реактивных форм кислорода [32, 37, 132].

Благодаря ингибированию синтеза эндотелиального констрикторного фактора эндотелина-1 и ограничению высвобождения норадреналина из симпатических нервных окончаний, NO участвует в регуляции базального тонуса системных, легочных и коронарных сосудов [112, 160].

Местную регуляцию тонуса сосудов NO осуществляет через изменение напряжения сдвига. При повышении уровня тканевого метаболизма происходит снижение уровня pO_2 , возрастание pCO_2 и уменьшение pH. Это стимулирует релаксацию прекапиллярных сфинктеров и усиление прекапиллярного кровотока. Этот процесс, в свою очередь, стимулирует гемоциркуляцию в вышележащих артериях и артериолах. Данные процессы приводят к усилению напряжения сдвига, что вызывает выработку простациклина. Простациклин включается в механизм простациклиновой вазодилатации, обеспечивающей адаптационные механизмы сердца и скелетной мускулатуры при кислородном голодании. Напряжение сдвига влечет за собой активацию ионных каналов, белков цитоскелета и изменение гликокаликса, возбуждение тирозинкиназных механорецепторов на поверхности эндотелия [124, 172]. Такой процесс запускает систему внутриклеточных мессенджеров и синтез биологически активных веществ, оказывающих местное и системное регуляторное воздействие. Так в микроциркуляторном сосудистом русле человека напряжение сдвига индуцирует эндотелий-зависимую NO-опосредуемую вазодилатацию. Снижение напряжения сдвига у пациентов с гипертонией и

гиперхолестеринемией сопровождается нарушением эндотелий-зависимой вазодилатации [136].

Постоянные физические тренировки увеличивают напряжение сдвига, и как, следствие, индуцируют экспрессию генов eNOS, что может лежать в основе формирования процессов адаптации [162]. Регулярные упражнения во второй половине беременности увеличивают экспрессию eNOS и генерацию NO, уменьшают образование свободнорадикального окисления в плаценте беременной женщины. Исследователи полагают, что в основе такого процесса может лежать увеличения напряжения сдвига эндотелия. Адаптация физическими упражнениями благотворно влияет на сердечно-сосудистую и антиоксидантную системы, что, в свою очередь, снижает риск развития преэклампсии, диабета или гипертензии во время беременности [145]. Gopi Krishna Kolluru с соавторами была установлена роль напряжения сдвига в клеточном ремоделировании и ангиогенезе. Эти процессы опосредованы субклеточной локализацией eNOS и продукцией монооксида азота [116, 164].

NO регулирует различные межклеточные взаимодействия, включая активацию тромбоцитов, ионный транспорт, митохондриальную функцию, ангиогенез, пролифериацию клеток, которые играют важную роль в гомеостазе сердечно-сосудистой системы [71, 170]. NO участвует в регуляции сердечного ритма и сократимости [19], ограничивает ремоделирование сердца и сосудов после ишемических повреждений [55, 159, 170], повышает защитные эффекты посткондиционирования [38, 131, 167]. На сократимость миокарда NO оказывает прямое отрицательное инотропное влияние, регулирует ответ кардиомиоцитов на адренергические и холинергические стимулы [112, 177], тормозит пролифериацию клеток гладкой мускулатуры [101], что выполняет антиатеросклеротическую функцию за счет торможения образования неоинтимы и утолщения стенок сосудов.

Известно противовоспалительное действие NO, обусловленное его способностью к ингибированию синтеза и экспрессии цитокинов и молекул клеточной адгезии [163, 179].

Открытие нитрергической иннервации гладких мышц сосудов привело к новому пониманию нейрогенного контроля сосудистой функции. NO, как нейротрансмиттер, играет ключевую роль в регуляции тонуса гладкомышечных клеток кровеносных сосудов. Монооксид азота, высвобождаемый нитрергическими нервами, обеспечивает релаксацию сосудов головного мозга и глазных артерий, клеток стенок желудка, кишечника и желчного пузыря [78], релаксацию клеток мочевого пузыря, дилатацию трахеи, играет роль в инициации и поддержании эрекции полового члена [169]. Известна роль нитрергических вазодилаторных нервов в реципрокной регуляции стенок артериол, что может играть роль в развитии артериальной гипертензии [85, 119, 169].

Оксид азота в сосудистой системе может сигнализировать о здоровье и болезни. В здоровом кровеносном сосуде монооксид азота (NO) и 1-цитруллин образуются из L-аргинина с помощью eNOS и кофакторов (например, восстановленный тетрагидробиоптерин (BH₄), тиолатсвязанный гемм, фловинадениндинуклеотид (ФАД), фловинмононуклеотид (ФМН), 5, 6, 7, 8-тетрагидробиоптерин, глутатион (возможно), кальмодулин и кальций (является коферментом только для NOS-3)) в эндотелии в ответ на напряжение сдвига и другие раздражители NO распространяется на подлежащие гладкомышечные клетки, и связывается с восстановленным гемом (Fe²⁺) в растворимой гуанилилциклазе (pГЦ), которая активирует фермент – циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), что приводит к вазодилатации [67].

В зависимости от количества доступных кофакторов и аргинина реакция может протекать двояко: с образованием NO (неразобшенная NOS), с образованием пероксидов (разобшенная NOS), а также параллельным синтезом NO и пероксидов (частично разобшенная NOS) (рис. 2.5).

Центральным событием в эндотелиальной дисфункции является уменьшение образования и биодоступность NO, которая вызвана окислительным стрессом и

разобщением eNOS [133]. Причиной появления данного состояния является нарушение димерной структуры фермента и усиление его мономеризации.

Когда кофактор BH₄ окисляется до дигидробиоптерина (BH₂), eNOS может разобщаться, и вместо продуцирования NO он образует супероксид (O₂⁻), который, в свою очередь, может реагировать с NO с образованием пероксинитрита (ONOO⁻), тем самым дополнительно ограничивая биодоступность NO. Более того, реакционноспособный кислород и азот могут окислять гем-группу в рГЦ (от Fe²⁺ до Fe³⁺), что делает ее нечувствительной к активации NO.

Подводя итоги анализа литературных данных можно выделить различные эффекты NO: к отрицательным эффектам (связанным с большим избытком NO, активных форм кислорода и ONOON) относятся атерогенный эффект, перегрузка клеток Ca²⁺, повреждение миокарда, проапоптотический эффект, прооксидантный эффект (снижение активности антиоксидантных ферментов), сократительная дисфункция миокарда и сосудистых гладких мышц, увеличение проницаемости сосудов. К положительным эффектам (связанным с относительно небольшим повышением уровня NO) можно отнести: адаптационную защиту организма, антиапоптотический, антиатерогенный, антиоксидантный, антипролиферативный и, антистрессорный эффект, вазодилатацию, иммунитет к инфекциям, вирусного, микобактериального и паразитарного происхождения, иммунитет при онкологических, заболеваниях, кардиопротекцию, противовоспалительный эффект, цитопротекцию. Становится очевидным, что существуют оптимальные концентрации NO, обладающие кардио- и вазопротекторным эффектом. Слишком маленькие или слишком большие количества NO являются опасными.

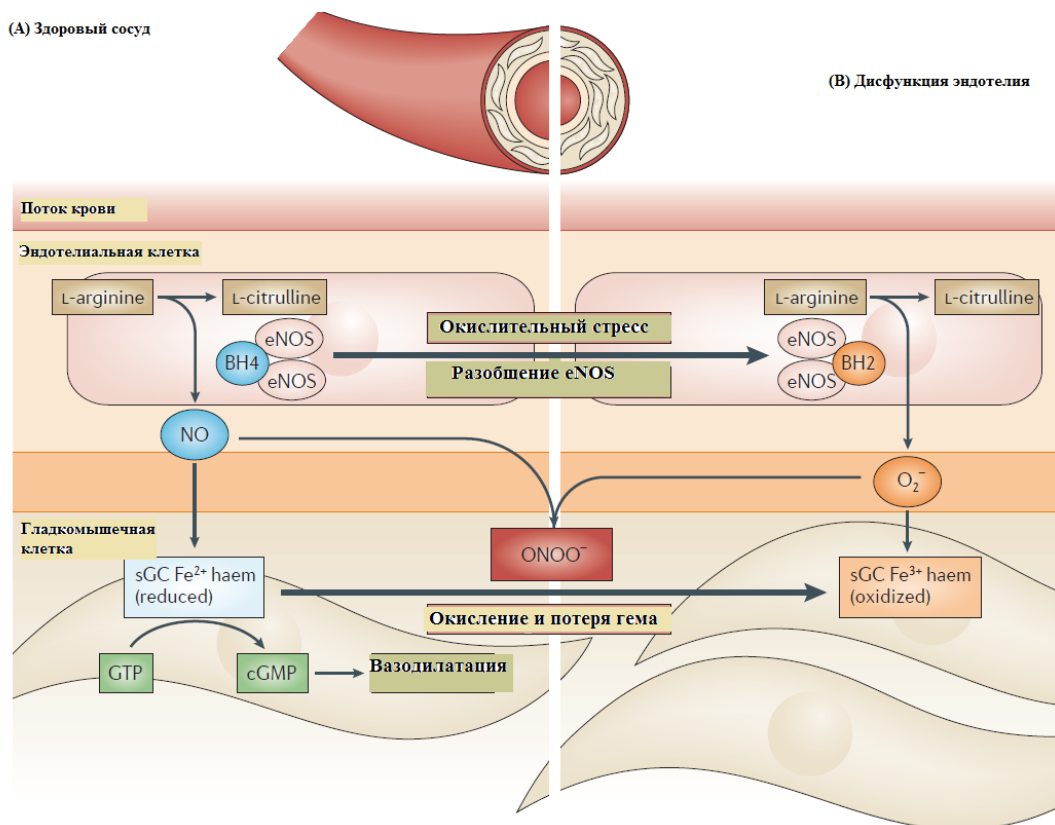


Рисунок 2.5. Механизм разобщения NOS

Знание этапов и молекулярных механизмов регуляции синтеза NO позволит контролировать активность этого фермента, что представляет несомненный интерес для практической медицины и имеет важное значение для выработки целенаправленной терапевтической стратегии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин, А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А. Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63 – С. 924-938.
2. Депонирование оксида азота в кровеносных сосудах *in vivo* / А. Ф. Смирин [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1999. – Т. 127, № 6. – С. 329-632.
3. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе / Е.Б. Манухина и др. // Известия АН. Серия биологическая. – 2002. Т. 5. – С. 585-596.
4. Депонирование оксида азота у крыс разных генетических линий и его роль в антистрессорном эффекте адаптации к гипоксии. / Пшенникова М.Г., Смирин Б.В., Бондаренко О.П., Малышев И.Ю. // Росс. физиол. ж-л им. И.М.Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 2. – С. 174-181.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
6. Реутов, В. П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нит-ритредуктазной компонент цикла оксида азота / В. П. Реутов // Биохимия. – 1999 – Т. 64, № 5. – С. 634-651.
7. Шебеко, В. И. Эндотелий и система комплемента / В. И. Шебеко. – Витебск: ВГМУ, 1999. – 149 с.
8. Шебеко, В.И. Редокс-регуляция характера фенотипа эндотелиоцитов: от хаоса к порядку // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2002. – Т.1, №1. – С.30-38.
9. 17-beta-Estradiol attenuates endotoxin-induced excessive nitric oxide production in ovariectomized rats *in vivo* / K. Kauser [et al.] // J. Physiol Heart Circ Physiol. – 1997. – Vol. 273. – P. 506–509.
10. A redox-based mechanism for the contractile and relaxing effects of NO in guinea-pig gall bladder / S. Alcon [et. al.] // J. of Physiol. – 2001. – Vol. 532, №3. – P.793-810.
11. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries / K.L. Andrews [et. al.] // Br J Pharmacol. – 2009. – Vol. 157, №4. – P. 540-50. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00150.x.
12. Abid, M. R. Antioxidant therapy: Is it your gateway to improved cardiovascular health? / M. R.Abid, F.W. Sellke // Pharm Anal Acta. – 2015. – Vol. 6. pii:323.
13. Activation of mitochondrial ATPdependent potassium channels by nitric oxide / N. Sasaki [et al.] // Circulation. – 2000. – Vol. 101. – P. 439-445
14. Activation of NUDT5, an ADP-ribose pyrophosphatase, by nitric oxide-mediated ADP-ribosylation / H.N. Yu [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2007. – Vol. 354, №3. – P. 764-8.
15. Ahern, P Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial K⁺ channels / P. Ahern, S. F. Hsu, M. B. Jackson // J. Physiol. – 1999. – Vol. 520, № 1. – P. 165–176.
16. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant / M. D. Randall [et al.] // Biochem. Biophys. res. commun.- 1996. - Vol. 229. – P. 114 - 120.
17. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation / S. Moncada [et al.] // Nature. – 1976. – Vol. 263. – P. 663-665.
18. Anti-arrhythmic effect of diosgenin in reperfusion-induced myocardial injury in a rat model: activation of nitric oxide system and mitochondrial KATP channel. // Badalzadeh R1, Yousefi B, Majidinia M, Ebrahimi H. // J Physiol Sci. 2014 Nov;64(6):393-400. doi: 10.1007/s12576-014-0333-8. Epub 2014 Aug 24.
19. Balligand, J. L. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system / J. L. Balligand, R. A. Kelly, P. A. Marsden, T. W. Smith, T. Michel // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 347-351.

20. Barbee, K.A. Effect of spatial heterogeneity and colocalization of eNOS and capacitative calcium entry channels on shear stress-induced NO production by endothelial cells: A modeling approach. / K.A.Barbee, J.B.Parikh, Y.Liu, D.G.Buerk, D. Jaron // *Cell Mol Bioeng.* – 2018. – Vol. 11, №2. – P. 143-155. doi: 10.1007/s12195-018-0520-4.
21. Barlow, R. S. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity / R. S. Barlow, R. E. White // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1998. – Vol. 75. – P. H1283-H1289. [PubMed: 9746477]
22. Barlow, R.S. H(2)O(2) opens BK(Ca) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle / R.S.Barlow, A.M. El-Mowafy, R.E. White // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H475–H483. [PubMed: 10924044]
23. Berwick, Z.C. Contribution of voltage-dependent K(+) channels to metabolic control of coronary blood flow / Z.C.Berwick, G.M. Dick, S.P. Moberly, M.C. Kohr, M. Sturek, J.D. Tune // *J Mol Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52. – P. 912-919. [PubMed: 21771599]
24. Bolton, T. B. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery / T. B. Bolton, R. J. Lang, T. Takewaki // *J. Physiol.* – 1984. – Vol. 351. – P. 549-572.
25. Brecht, D.S. Nitric oxide: physiologic messenger molecule / D.S.Brecht, S.H.Snider // *Annu.Rev.Biochem.* –1994. –Vol.63. –P.175-195.
26. Brown, S. A. Effects of inhibition of nitric oxide synthase on systemic arterial pressure and renal vascular resistance in rats / S. A. Brown // *Res. Vet. Sci.* – 1993 – Vol. 55, N 3. – P. 398-400.
27. Burgoyne, J.R. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system / J.R. Burgoyne, S.Oka, N. Ale-Agha, P.Eaton // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18. – P. 1042-1052. [PubMed:22867279]
28. Busse, R. Vascular endothelium and blood flow / R.Busse, Fleming, I.Handb // *Exp Pharmacol.* – 2006. – Vol. 176 (Pt 2). – P. 43-78.
29. Cameron, J.S. Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress / J.S. Cameron, R. Baghdady // *Cardiovasc Res.* –1994. – Vol. 28. – P. 788–796.
30. Campbell, W. B. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors / W. B. Campbell, D. Gebremedhin, P. F. Pratt, D. R. Harder // *Circ Res.* – 1996. – Vol. 78. – P. 415–423.
31. Cardioprotection by ischemic postconditioning and cGMP-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. / Frankenreiter S. [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2018. doi: 10.1093/cvr/cvy039.
32. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I / E. T. Chouchani [et al.] // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19. – P. 753–759.
33. Cardioprotective role of endogenous hydrogen peroxide during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo / T. Yada [et.al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. H1138–H1146. [PubMed: 16648191]
34. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide / M.S. Joshi, J.L. Ponthier, J.H. Lancaster // *Free Radic.Biol.Med.* – 1999. – Vol.27. – P.1357-1366.
35. Chidgey, J. Reactive oxygen species facilitate the EDH response in arterioles by potentiating intracellular endothelial Ca(2+) release / J.Chidgey, P.A.Fraser, P.I. Aaronson // *Free Radic Biol Med.* – 2016. – Vol. 97. – P. 274-284. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.010.
36. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries / M. T. Nelson [et al.] // *J. Physiol.* – 1997. – Vol. 502. – P. 259-264.
37. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning / T. Rassaf [et al] // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114. – P. 1601–1610.
38. Cohen, M. V., Downey, J. M. Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector. *Antioxid.* / Cohen, M. V., Downey, J. M. // *Redox Signal* – 2011. – Vol. 14. – P. 821–831.

39. Coleman, H. A. Myoendothelial electrical coupling in arteries and arterioles and its implications for endothelium-derived hyperpolarizing factor // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2002. – Vol. 29. – P. 630-637.
40. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed / J. J. Hwa [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. H952-H958.
41. Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery / S. J. Wigg [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. H232-H240
42. Contribution of Na⁺-K⁺ pump and Kir current to extracellular pH-dependent changes of contractility in rat superior mesenteric artery / M. Y. Kim [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – P. H792-H800.
43. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium / L. Nascimben [et al.] // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94. – P. 1894-1901.
44. Cseko, C. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways / C. Cseko, Z. Bagi, A. Koller // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – Vol. 97. – P. 1130-1137.
45. Davis, M. J. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells / M. J. Davis, J. A. Donovitz, J. D. Hood // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1992. – Vol. 262. – P. 1083–1088.
46. Davis, M. J. Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells / M. J. Davis, G. A. Meininger, D. C. Zawieja // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1992. – Vol. 263. – P. 1292–1299.
47. Dawes, G. S. The vaso-dilator action of potassium / G. S. Dawes // *J. Physiol (London).* – 1941. – Vol.99. – P.224-238.
48. De Vriese, A. S. Effects of connexin-mimetic peptides on nitric oxide synthase- and cyclooxygenase-independent renal vasodilation / A. S. De Vriese, I. Van de Voorde, N. H. Lameire // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 61. – P. 177-185.
49. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine / K.M. Kim [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2001. – Vol. 30, №7. – P. 747-56.
50. Dimmeler, S. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Dimmeler, F. Lottspeich, B. Brune // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 1671-1674.
51. Dinc, M.E. Thiol/disulfide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients / M.E. Dinc, C. Ozdemir, N.N. Ayan, N. Bozan, S. Ulusoy, C. Koca, O. Erel // *Laryngoscope.* – 2017. – Vol. 127, №7. – P. E244-E250. doi: 10.1002/lary.26444.
52. Dinerman, J. L. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease / J. L. Dinerman, C. J. Lowenstein, S. H. Snyder // *Circul. Res.* – 1993. – Vol. 73, N 2. – P. 217-222.
53. Doughty, J. M. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium / J. M. Doughty, E. Plane, P. D. Langton // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 1107-1112.
54. Dunn, S.M. Decreased EDHF-mediated relaxation is a major mechanism in endothelial dysfunction in resistance arteries in aged mice on prolonged high-fat sucrose diet. / S.M. Dunn, R.H. Hilgers, K.C. Das // *Physiol Rep.* – 2017. – Vol. 5, №23. pii: e13502. doi: 10.14814/phy2.13502.
55. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling / *Frontiers in immunology/inflammation.* – 2013. – Vol.4, Article 111. – P. 1-12.
56. EDHF 2002 edited by P. Vanhoutte. – Taylor and Francis. – 2003. – P. 417
57. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. / S. Makhoul [et. al.] // *Nitric Oxide.* – 2018. pii: S1089-8603(17)30352-X. doi: 10.1016/j.niox.2018.03.008.

58. Ellinsworth, D.C. Endothelium-derived hyperpolarization and coronary vasodilation: Diverse and integrated roles of epoxyeicosatrienoic acids, hydrogen peroxide, and gap junctions. / D.C. Ellinsworth, S.L. Sandow, N. Shukla, Y. Liu, J.Y. Jeremy, D.D. Gutterman // *Microcirculation*. – 2016. – Vol. 23. – P. 15-32. [PubMed:26541094]
59. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo / T. Suvorava [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – P. 2487-2495.
60. Endothelial cell-induced cytoglobin expression in vascular smooth muscle cells contributes to modulation of nitric oxide / B. Lilly [et. al.] // *Vascul Pharmacol*. – 2018. – Vol.110. – P. 7-15. doi: 10.1016/j.vph.2018.06.016. Epub 2018 Jun 30.
61. Endothelial SIRT1 prevents age-induced impairment of vasodilator responses by enhancing the expression and activity of soluble guanylyl cyclase in smooth muscle cells / Y.Guo [et al.] // *Cardiovasc Res*. – 2018. doi: 10.1093/cvr/cvy212.
62. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries / M. Nakashima [et al.] // *J. Clin. Invest*. – 1993. – Vol. 92. – P. 2867-2871.
63. Epoxyeicosatrienoic acids mediate insulin-mediated augmentation in skeletal muscle perfusion and blood volume / C.Y. Shim [et. al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2014. – Vol. 307, №12. – P. E1097-1104. doi: 10.1152/ajpendo.00216.2014.
64. Ertracht, O. The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia / O. Ertracht, A. Malka, S. Atar, O. Binah // *Pharmacol. Ther*. – 2014. – Vol. 142. – P. 33-40.
65. Erythropoietin enhances hydrogen peroxide-mediated dilatation of canine coronary collateral arterioles during myocardial ischemia in dogs in vivo / T. Yada [et.al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2010. – Vol. 299. – P. H1928–H1935. [PubMed: 20870805]
66. Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries / F. Plane [et al.] // *Br. J. Pharmacol*. – 1997. – Vol.121. – P. 1509-1511.,
67. Farah, C. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. / C.Farah, L.Y.M. Michel, J.L. Balligand // *Nat Rev Cardiol*. – 2018. doi: 10.1038/nrcardio.2017.224.
68. Feletou, M. EDHF: new therapeutic targets? / M. Feletou, P. M. Vanhoutte // *Pharmacol Res*. – 2004. – Vol. 49. – P. 595-580.
69. Félétou, M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells / M. Félétou, P.M. Vanhoutte // *Acta Pharmacol Sin*. – 2000. – Vol. 21, №1. – P. 1-18.
70. Fleming, I. The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling / I. Fleming // *Vascul Pharmacol*. 2016 Nov;86:31-40. doi: 10.1016/j.vph.2016.03.001.
71. Forstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W. C. Sessa // *Eur. Heart J*. – 2012. – p Vol. 33. – P. 829–837
72. Furchgott, R. F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R. F. Furchgott, J. V. Zavadzki // *Nature*. – 1980. – Vol. 299. – P. 373-376.
73. Galle, J. Arterial size determines the enhancement of contractile responses after suppression of endothelium-derived relaxing factor formation / J. Galle, J. Bauersachs, E. Bassenge, R. Busse // *Pflugers Arc*. – 1993. – Vol. 422. – P. 564-569.
74. Gap junctions and connexin expression in the inner ear / A. Forge [et. al.] // *Novartis Found Symp*. –1999. – Vol. 219. – P. 134-150
75. Garg, C, NO-sGC-cGMP signaling influence the anxiolytic like effect of lithium in mice in Light and dark box and elevated pus maze / C. Garg V, M.Garg // *Brain Res*. – 2018. pii: S0006-8993(18)30506-7. doi: 10.1016/j.brainres.2018.10.002. [Epub ahead of print]
76. Gauthier, K. Potassium channels and membrane poteutial in vascular endothelial and smootk muscle cells / K. Gauthier, N. Rusch // *EDHF 2002*. – Taylor and Francis. – 2003. – P. 1-12.
77. Gross, G.J. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs / G.J. Gross, J.A. Auchampach // *Circ Res*. – 1992. – Vol. 70. – P. 223-233

78. Gultekin, H. The role of nitric oxide in the electrical field stimulation-induced contractions of sphincter of oddi and gallbladder strips in Guinea pigs / H. Gultekin, S.R., S. Erdem Emre-Aydingoz, M. Tuncer // *J Pharmacol Sci.* – 2006. – Vol. 101, №3. – P. 240-244.
79. H₂O₂-induced redox-sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels / P.A. Rogers [et. al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. H2473–H2482. [PubMed: 16751285]
80. Haddy, F. J. Metabolic factors in peripheral circulatory regulation / F. J. Haddy, J. B. Scott // *Federation Proc.* – 1975. – Vol.34. – P.1975.
81. Haddy, F. J. Metabolically linked vasoactive chemicals in local regulation of blood flow / F. J. Haddy, J. B. Scott // *J. Physiol.* – 1968. – Vol.48. – P.688-707.
82. Haddy, F. J. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure / F. J. Haddy, P. M. Vanhoutte, M. Feletou // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. –Vol. 290. – R546–R552.
83. Hadinnapola, C. The resistance-compliance product of the pulmonary circulation varies in health and pulmonary vascular disease. / C. Hadinnapola, Q. Li, L. Su, J. Pepke-Zaba, M. Toshner // *Physiol Rep.* – 2015. – Vol. 3, №4. pii: e12363. doi: 10.14814/phy2.12363.
84. Hamzaoui, M. Cardiovascular consequences of chronic kidney disease, impact of modulation of epoxyeicosatrienoic acids / M.Hamzaoui, D.Guerrot, Z.Djerada, T.Duflot, V.Richard, J.Bellien // *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* – 2018. – Vol. 67, №3. – P. 141-148. doi: 10.1016/j.ancard.2018.04.018.
85. Han, X. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate / X. Han, Y. Shimoni, W. R. Giles // *J. Physiol.* – 1994. – Vol. 476. – P. 309-314.
86. Heinele, H. Vasoconstriction of carotid artery induced by hydroperoxides / H. Heinele // *Arch. Int. Physiol. Biochim.* – 1984. – Vol. 92. – P. 267-271.
87. Hemmrich, K. iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage / K. Hemmrich, Ch.V. Suschek, G. Lerzynski, V. Kolb-Bachofen. *J Appl Physiol.* – 2003. – Vol. 95. – P. 1937-1946
88. Hill, C. E. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds / C. E. Hill, J. K. Phillips, S. L. Sandow // *Med. Res. Rev.* – 2001. – Vol.21. – P. 1-60.
89. Hille, B. Ionic Channels of Excitable Membranes / B. Hille. – 2-nd ed. – Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 1992. – P. 115–139.
90. Himmel, H. M. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells / H. M. Himmel, A. R. Whorton, H. C. Strauss // *Hypertension.* – 1993. – Vol. 21. – P. 112-127.
91. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice / T. Matoba [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 106. – P. 1521-1530.
92. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo / T. Yada [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 1040-1045.
93. Hydrogen peroxide: A feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow / S. Saitoh [et. al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2614-2621. [PubMed:17023676]
94. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase / P. L. Huang [et al.] // *Nature.* – 1995. – Vol. 377. – P. 239-242.
95. Iadecola, C. Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. / C. Iadecola, T. Kahles, E.F. Gallo, J. Anrather // *J Physiol.* – 2011. – Vol. 589, №17. – 4137-4145. doi: 10.1113/jphysiol.2011.210831.
96. Identification of inducible nitric oxide synthase in peripheral blood cells as a mediator of myocardial ischemia/reperfusion injury. / Guo, Y. [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 2012. – Vol.107, №2. – P. 253. doi: 10.1007/s00395-012-0253-9.
97. Inducible nitric oxide synthase in the myocard / I. Buchwalow [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – 217, № 1–2. – P. 73–82.

98. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice / P. Jumrussirikul [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1998 – Vol. 102. – P. 1279-1285.
99. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor / S. L. Sandow [et al.] // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 1108-1113.
100. Involvement of the NO/sGC/cGMP/K⁺ channels pathway in vascular relaxation evoked by two non-quinazoline α 1-adrenoceptor antagonists / M.Kubacka [et. al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 103. P. 157-166. doi: 10.1016/j.biopha.
101. Jeremy, J.Y. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells / J.Y. Jeremy, D. Rowe, A.M. Emsley, A.C. Newby // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 43. – P. 580-594.
102. Jones, S. P. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection / S. P. Jones, R.Bolli // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2006. – Vol. 40. – P. 16–23.
103. Kilpatrick, E. V. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery / E. V. Kilpatrick, T. M. Cocks // *Br. J. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 112. – P. 557-565.
104. Knot, H. J. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat via Ca²⁺-dependent K⁺-channels / H. J. Knot, N. B. Standen, M. T. Nelson // *J. Physiol.* – 1998. – Vol. 508. – P. 211–221.
105. Koch, M.A. Influence of nitric oxide on the hemodynamic response to hemorrhage in conscious rabbits / M.A. Koch, E.M. Hassler, J.C. Schadt // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 37. – P. R171-R182.
106. Kohlgrüber, S. Regulation of Transcription Factors by Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Vascular Physiology and Pathology. / S. Kohlgrüber, A. Upadhye, N. Dyballa-Rukes, C.A. McNamara, J. Altschmied // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. Vol. 26, №13. – P. 679-699. doi: 10.1089/ars.2016.6946.
107. Kojda, G. Regulation of basal myocardial function by NO / G. Kojda, K. Kottenberg // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 41. – P. 514-523.
108. Koller, A. Shear stress dependent regulation of vascular resistance in health and disease: role of endothelium / A. Koller, G. Kaley // *Endothelium.* – 1996. – Vol. 4. – P. 247-272.
109. Konold, P. The mechanical response of isolated arteries to potassium / P. Konold, G. Gebert, K. Brecht // *Experientia.* – 1968. – Vol.24. – P. 247-248.
110. Lang N. Connexin 43 mediates endothelium-derived hyperpolarizing factor-induced vasodilatation in subcutaneous resistance arteries from healthy pregnant women / N. Lang, L. Luksha, D. Newby, K. Kublickiene // *Am. J Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. H1026-H1032.
111. Lee, C.H. KMUP-1 protects against streptozotocin-induced mesenteric artery dysfunction via activation of ATP-sensitive potassium channels / C.H. Lee, Z.K. Dai, C.T. Yen, S.L. Hsieh, B.N. Wu // *Pharmacol Rep.* – 2018. – Vol. 70, №4. – P. 746-752. doi: 10.1016/j.pharep.2018.02.017.
112. Levin, E.R. Endothelins / E.R. Levin // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol. 323. – P. 356-363.
113. Li, W. The protective effects of estrogen on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Ang II/AT1R pathway / W.Li, Li D, L.Sun, Z.Li, L.Yu, S.Wu // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – Vol. 503, №4. – P. 2543-2548. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.013.
114. Liu, Y. High glucose impairs voltage-gated K(+) channel current in rat small coronary arteries / Y. Liu, K. Terata, N.J. Rusch, D.D. Gutterman // *Circ Res.* – 2001. – Vol. 89. – P. 146–152. [PubMed: 11463721]
115. Lopez-Barneo, J. Cellular mechanism of oxygen sensing / J. Lopez-Barneo, R. Pardal, P. Ortega-Saenz // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 259-287.
116. Low shear stress induces vascular eNOS uncoupling via autophagy-mediated eNOS phosphorylation. / J.X. Zhang [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2018. – Vol. 1865, №5:709-720. doi: 10.1016/j.bbamcr.

117. Lozano, G. Control of coronary blood flow by endothelial release of nitric oxide / G. Lozano, P. Pagliaro, D. Gatullo, N.A. Marsh // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1994. – Vol. 21. – P. 783-789.
118. Lucchesi, P. A. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries / P. A. Lucchesi, S. Belmadani, K. Matrougui // *J. Hypertens.* – 2005. – Vol. 23. – P. 571-579.
119. Minami, N. Role of nitric oxide in the development of vascular α_1 -adrenoreceptor desensitization and pressure diuresis in conscious rats. / N. Minami, Y. Imai, H. Nishiyama, K. Abe // *Hypertension.* – 1997. – Vol. 29. – P. 969-975.
120. Miyoshi, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K1 channel of vascular smooth muscle cells / H. Miyoshi, Y. Nakaya, H. Moritoki // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 345. – P. 47-49
121. Mohanty, I. Acidosis potentiates endothelium-dependent vasorelaxation and gap junction communication in the superior mesenteric artery / I. Mohanty, S.C. Parija, S. Suklabaidya, S. Rattan // *Eur J Pharmacol.* – 2018. – Vol. 827. P. 22-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.03.004.
122. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology / S. Moncada, R. Palmer, E. Higgs // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – 43. – P. 109-142.
123. Moncada, S. The L-arginine–nitric oxide pathway / S. Moncada, A. Higgs // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 2002–2012.
124. Ngai, C.Y. Vascular Responses to Shear Stress: The Involvement of Mechanosensors in Endothelial Cells / C.Y. Ngai, X. Yao // *Circulation and Vascular Journal.* – 2010. – Vol. 3. – P. 85-94
125. Nishikawa, Y. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo / Y. Nishikawa, D.W. Stepp, W.M. Chilian // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2000. – Vol. 279, №2. – P. H459-65.
126. Nitric oxide and cardiac function. / R. Rastaldo [et al.] // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81, №10. – P. 779-793.
127. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular / V.M. Bolotina [et al.] // *Nature.* – 1994. – Vol. 368. – P. 850–853.
128. Nitric oxide donation and nitrite assays in the presence of thiols and albumin as determined by Griess' and Werlingloer's method / J. Robak [et al.] // *Pol. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 49, N 4. – P. 255-262.
129. Nitric oxide is produced via 5-HT1B and 5-HT2B receptor activation in human coronary artery endothelial cells / T. Ishida [et al.] // *Kobe. J. Med. Sci.* – 1998. – Vol. 44, N 2. – P. 51-63
130. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis / W. Bloch [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – 43. – P. 675-684
131. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits / Takano, H. [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol. 98. – P. 441–449.
132. Nitrite augments tolerance to ischemia/ reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer / Shiva, S. [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204. – P. 2089-2102.
133. Nox2 dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury / F. Wu [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2014. – Vol. 307. – P. L987-L997.
134. Padmasekar, M. Stimulation of cardiomyogenesis of embryonic stem cells by nitric oxide downstream of AMP-activated protein kinase and mTOR signaling pathways. / M. Padmasekar, F. Sharifpanah, A. Finkensieper, M. Wartenberg, H. Sauer // *Stem Cells Dev.* – 2011. – Vol. 20, №12. – P. 2163-2175. doi: 10.1089/scd.2010.0581.
135. Palmer, R. M. J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor / R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – P. 524-526.

136. Paniagua, O.A. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients / O.A. Paniagua, M. B. Bryant, J.A. Panza // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103, №13. – P. 1752-1758.
137. Peroxynitrite and protein nitration in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy / R.Stavniichuk [et al.] // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2014. – Vol. 30, №8. – P. 669-78. doi: 10.1002/dmrr.2549.
138. Peroxynitrite inhibits Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles / Y.Liu [et. al.]. // *Circ Res*. 2002. – Vol. 91. – P. 1070–1076. [PubMed: 12456494]
139. Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats. T.O. Nossuli, R. Hayward, R. Scalia, A.M. Lefer // *Circulation*. – 1997. – Vol.96, № 7. – P.2317-2324.
140. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide / R.B. Muijsers [et al.] // *Life. Sci*. – 1997. – Vol. 60. – P. 1833-1845.
141. Possible Interactions Between 5-HT_{2A} Receptors and the Endocannabinoid System in Humans: Preliminary Evidence of Interactive Effects of Ayahuasca and Endocannabinoids in a Healthy Human Subject / R.G. Dos Santos [et. al.] // *J Clin Psychopharmacol*. – 2018. doi: 10.1097/JCP.0000000000000973.
142. Preliminary Studies of Acute Cadmium Administration Effects on the Calcium-Activated Potassium (SKCa and BKCa) Channels and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase Activity in Isolated Aortic Rings of Rats / D.V. Vassallo [et.al.] // *Biol Trace Elem Res*. – 2018. – Vol. 183, №2. – P. 325-334. doi: 10.1007/s12011-017-1150-8.
143. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia / T.M. Wize mann [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 1994. – Vol. 56. – P. 759-768.
144. Quilley, J. K^{+} -induced vasodilation in the rat kidney is dependent on the endothelium and activation of K^{+} channels / J. Quilley, Y. Qiu // *Eur. J. Pharmacol*. – 2005. – Vol. 508. – P. 193-199.
145. Ramírez-Vélez, R. Effect of exercise training on eNOS expression, NO production and oxygen metabolism in human placenta / R. Ramírez-Vélez, J. Bustamante, A. Czerniczyniec, A.C. Aguilar de Plata, S. Lores-Arnaiz // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №11. e80225
146. Randall, M. D. Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances / M. D. Randall, D. A. Kendall // *Trends Pharmacol. Sci*. – 1998. – Vol. 19. – P. 55-58.
147. Redox signaling of the arteriolar myogenic response / P. T. Nowicki [et al.] // *Circ. Res*. – 2001. – Vol. 89. – P. 114-116.
148. Rees, D. D. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure / D. D. Rees, R. M. Palmer, S. Moncada // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1989. – Vol. 86. – P. 3375–3378.
149. Riedel, M. Direct effects of estrogens on the vascular tone: characterisation and clinical importance / M. Riedel, A. Mugge // *Zeitschrift Fur Kardiologia*. – 1994. – Vol. 83, № 10 – P. 768–774.
150. Rogers, P.A. H_2O_2 activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive K_v channels in coronary vascular smooth muscle / P.A. Rogers, W.M. Chilian, I.N. Bratz, R.M. Jr Bryan, G.M. Dick // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2007. – Vol. 292. – P. H1404–H1411. [PubMed: 17071731]
151. Role for endothelium derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hind limb circulations in vivo / H. C. Parkington [et al.] // *J. Physiol*. – 2002. – Vol. 542. – P. 929–937.
152. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles / H. Miura [et al.] // *Circ. Res*. – 2003. – Vol. 2. – P. 31-40.
153. Salt inactivates endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. / J. Li [et al.] // *J Nutr*. – 2009. – Vol. 139, №3. – P. 447-51. doi: 10.3945/jn.108.097451.

154. Sandow, S.L. Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function? / S.L. Sandow, C.B. Neylon, M.X. Chen, C.J. Garland // *J Anat.* – 2006. – Vol. 209, №5. – P. 689-98
155. Santulli, G. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease / G. Santulli, D. Lewis, A. des Georges, A.R. Marks, J. Frank // *Subcell Biochem.* – 2018. – Vol. 87. – P. 329-352. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_11.
156. Sasaki, N. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide / N. Sasaki, T. Sato, A. Ohler, B. O'Rourke, E. Marban // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101. – P. 439-445.
157. Sasser, J.M. Blood pressure, sex, and female sex hormones influence renal inner medullary nitric oxide synthase activity and expression in spontaneously hypertensive rats. / J.M. Sasser, K.N. Brinson, A.J. Tipton, G.R. Crislip, J.C. Sullivan // *J Am Heart Assoc.* – 2015. – Vol. 4, №4. pii: e001738.
158. Sato, A. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles / A. Sato, I. Sakuma, D. D. Gutterman // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. H2345-H2354.
159. Schleicher, M. Are the Mechanisms for NO-Dependent Vascular Remodeling Different From Vasorelaxation In Vivo? / M. Schleicher, W.C. Sessa // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2008. – Vol. 28. – a P. 1207-1208
160. Schwarz, P. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves / P. Schwarz, R. Diem, N.J. Dun, U. Forstermann // *Circulat. Res.* – 1995. – Vol. 77. – P. 841-848.
161. Seddon, M. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signaling / M. Seddon, A. M. Shah, B. Casadei // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 75. – P. 315-326.
162. Sessa, W.C. Chronic exercise in dog increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression / W.C. Sessa, K. Pritchard, N. Seyedi // *Circulat. Res.* – 1994. – Vol. 74. – P. 349-353.
163. Sharma, J.N. Role of nitric oxide in inflammatory diseases / Sharma J.N., Al-Omran A., Parvathy S.S. // *Inflammopharmacology.* – 2007. – Vol. 15, №6. – P. 252-259.
164. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis / G. K. Kolluru [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 304–315
165. Similarities in the pharmacological modulation of reactive hyperemia and vasodilation to hydrogen peroxide in rat skeletal muscle arterioles: effect of probes for endothelium-derived mediators / M. S. Wolin [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1990. – Vol. 253. – P. 508-512.
166. S-Nitrosylation signaling in cell biology Gaston B.M., Carver J., Doctor A., A. Palmer L.A. // *Mol.Interv.* – 2003. – Vol. 3, №5. – P.253-263.
167. Tang, L. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure / L. Tang, H. Wang, M. T. Ziolo // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 142. – P. 306-315.
168. Thengchaisri, N. Hydrogen peroxide induces endotheliumdependent and – independent coronary arteriolar dilation: Role of cyclooxygenase and potassium channels / N.Thengchaisri, L.Kuo // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. H2255–H2263. [PubMed: 14613908]
169. Toda, N. The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels / N. Toda, T. Okamura // *Pharmacol Rev.* – 2003. – Vol. 55, №2. – P. 271–324
170. Totzeck, M. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and Cardioprotection. / M. Totzeck, U.B. Hendgen-Cotta, T. Rassaf // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – Vol. 982. – P. 335-346. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_18.
171. Tune, G. Regulation of Coronary Blood Flow / G. Goodwill, M. Alexander, D. Johnathan // *Compr Physiol.* – 2018. – Vol.7, №2. – P. 321–382. doi:10.1002/cphy.c160016.

172. Vasoconstrictor stimulus determines the functional contribution of myoendothelial feedback to mesenteric arterial tone. / R. Wei, [et al.] // *J Physiol.* – 2018. doi: 10.1113/JP274797.
173. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients / S. Taddei [et al.] // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100. – P. 1400-1405.
174. Verwey, L.J. Gap junctions and memory: an investigation using a single trial discrimination avoidance task for the neonate chick / L.J. Verwey, T.M. Edwards // *Neurobiol Learn Mem.* – 2010. – Vol. 93, №2. – P. 189-95. doi: 10.1016/j.nlm.2009.09.010.
175. Villalón, C.M. The Role of 5-Hydroxytryptamine in the Pathophysiology of Migraine and its Relevance to the Design of Novel Treatments. / C.M.Villalón, A.M. VanDenBrink // *Mini Rev Med Chem.* – 2017. – Vol. 17, №11. – P. 928-938. doi: 10.2174/1389557516666160728121050.
176. Walewska, A. Gas Signaling Molecules and Mitochondrial Potassium Channels. / A.Walewska, A. Szewczyk, P.Koprowski // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol.19, №10. pii: E3227. doi: 10.3390/ijms19103227.
177. Welch, G. Nitric oxide and cardiovascular system / Welch G., Loscalzo J. // *J. Cardiovasc. Surg.* – 1994. – Vol. 9. – P. 361-371.
178. Welsh, D.G. Endothelial signaling and the dynamic regulation of arterial tone: A surreptitious relationship / D.G.Welsh, T.A. Longden // *Microcirculation.* – 2017. – Vol. 24, №3. doi: 10.1111/micc.12370.
179. West, I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes / I.C. West // *Diabet. Med.* – 2000. – Vol. 17. – P. 171-180.
180. Xu, L. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation / L. Xu, J. P. Eu, G. Meissner, J. S. Stamler // *Science.* – 1998. – Vol. 279. – P. 234-237.
181. Yamanaka, A. Characterization of endotheliumdependent relaxation independent of NO and prostaglandins in guinea pig coronary artery / A. Yamanaka, T. Ishikawa, K. Goto // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1998. – Vol. 285. – P. 480–489. [PubMed: 9580587]
182. Yeboah, M.M. Role of the cytochrome P-450/ epoxyeicosatrienoic acids pathway in the pathogenesis of renal dysfunction in cirrhosis / M.M.Yeboah, M.A.Hye Khan, M.A.Chesnik, M.Skibba, L.L.Kolb, J.D. Imig // *Nephrol Dial Transplant.* – 2018. – Vol.33, №8. – P.1333-1343. doi: 10.1093/ndt/gfx354.
183. Zhang, D.X. H2O2-induced dilation in human coronary arterioles: Role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca2+-activated K+ channel activation / D.X. Zhang, L. Borbouse, D. Gebremedhin, S.A. Mendoza, N.S. Zinkevich, R. Li, D.D. Gutterman // *Circ Res.* – 2012. – Vol. 110. – P. 471–480. [PubMed: 22158710]
184. Zhang, Y.H. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress / Y.H. Zhang // *F1000Res.* 2017 May 23;6:742. doi: 10.12688/f1000research.10128.1.

ГЛАВА 3

КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ И РЕГУЛЯЦИЯ СОСУДИСТОГО ТОНУСА

3.1. Классификация, функции калиевых каналов и их локализация в клетках различных органов

K^+ -каналы участвуют в формировании мембранного потенциала покоя (МП), в реполяризации мембраны во время потенциала действия (ПД), формируют следовую гиперполяризацию, модулируют повторную активность, регулируют секрецию медиатора из окончания нервных клеток, имеют важное значение в формировании механизмов памяти и обучения [7, 75].

Калиевые каналы вовлечены в управление пролиферацией клетки, апоптоз, синтеза NO [114], в развитие опухолей и секрецией инсулина [24, 37], принимают участие в транспорте электролитов в эпителии, например в канальцах почки или в ободочной кишке млекопитающих, регулируют сокращение миомерия [82, 112]. K^+ -каналы в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках принимают участие в регуляции тонуса сосудов, а их состав и активность изменяется во время сердечно-сосудистых заболеваний [49, 136].

Выделяют несколько подгрупп калиевых каналов: потенциалзависимые (K_v), кальцийактивируемые (K_{Ca}), двухпоровые (K_{2P}) и калиевые каналы внутреннего выпрямления (K_{ir}), а также АТФ-чувствительные K^+ каналы [73, 124]. К-каналы составляют наиболее представительный и разнообразный класс ионных каналов относительно кинетических свойств, регуляции, фармакологии и структуры. Такое разнообразие обусловлено большим количеством генов, кодирующих субъединицы канала, альтернативным сплайсингом, участием вспомогательных субъединиц и модуляцией каналов посттрансляционной модификацией и другими механизмами. Калиевые каналы могут регулироваться изменением потенциала, G-белками, внутриклеточными вторичными посредниками, являются мишенью действия фармакологических агентов [106].

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудистой стенки содержат семейство калиевых каналов, к которым относятся калиевые каналы внутреннего выпрямления, АТФ-чувствительные, потенциалзависимые K^+ каналы и три типа активируемых Ca^{2+} калиевых каналов (SK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы малой проводимости; IK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы средней проводимости; BK_{Ca} – активируемые кальцием калиевые каналы большой проводимости) [26, 42, 117]. Существует несколько уникальных особенностей, которые отличают эндотелиоциты и гладкомышечные клетки от кардиомиоцитов и нейронов. Во-первых, из-за того, что в их мембране отсутствуют потенциалзависимые натриевые каналы, обеспечивающие вход ионов натрия в клетку, деполяризация эндотелиальных клеток возникает благодаря подавлению выхода калия из клетки. Во-вторых, ионы Ca^{2+} поступают в эндотелиоцит через кальциевые каналы, нечувствительные к изменению разности потенциалов. В-третьих, мембранный потенциал покоя в эндотелиальных и гладкомышечных клетках находится в пределах от -35 до -60 мВ, что значительно меньше, чем в кардиомиоцитах и нейронах (от -70 до -90 мВ). В-четвертых, благодаря наличию плотных соединений (gap junction) эндотелиоциты и гладкомышечные клетки электрически сопряжены между собой. Это позволяет ионам проникать в соседние клетки, и таким образом координировать электрические события и уровень возбудимости в пределах сосудистой стенки.

Гиперполяризация мембраны эндотелиоцита, возникающая после открытия калиевых каналов, приводит к поступлению ионов кальция внутрь клетки и высвобождению вазодилаторных субстанций. В тоже время, увеличение проницаемости калиевых каналов, находящихся в мембране гладкомышечной клетки, сопровождается уменьшением поступления в нее кальция. Это противоречие связано с тем, что в

мембранах гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов экспрессируются различные по свойствам кальциевые каналы. В эндотелиальных клетках преимущественно находятся нечувствительные к изменению мембранного потенциала кальциевые каналы [64, 99]. Вызываемая выходом калия гиперполяризация мембран эндотелиоцитов приводит к увеличению электрического градиента, благодаря которому ионы Ca^{2+} через катионные каналы входят в клетку. Следовательно, в цитоплазме эндотелиоцита увеличивается концентрация Ca^{2+} , активируется синтез и высвобождение вазодилаторных метаболитов. В тоже время гиперполяризация мембраны гладкомышечной клетки, вызванная увеличением проницаемости калиевых каналов, сопровождается закрытием потенциалзависимых Ca^{2+} каналов и развитием вазодилатации.

Таким образом, благодаря экспрессии различных типов кальциевых каналов гиперполяризация эндотелиоцитов увеличивает вход Ca^{2+} внутрь клетки и активирует синтез и высвобождение вазодилаторных субстанций, а в гладкомышечных клетках – наоборот, уменьшает вход Ca^{2+} , что также приводит к расслаблению гладкой мышцы и расширению сосуда.

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудистой стенки содержат различную уникальную популяцию K^+ каналов. Кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca} -каналы) обнаружены в многочисленных клетках: в лимфоцитах [42], красных клетках крови [8], нейронах центральной нервной системы [2], гладких миоцитах мочевого пузыря [1, 21], трахеи [82, 98], включая гладкомышечные [42], но отсутствуют в эндотелиоцитах [Nelson, M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M.T. Nelson, J.M. Quayle // J. Physiol. – 1995. – Vol. 268. – P. 799–822.]. K_{ATP} -каналы обнаружены в многочисленных клетках, включая гладкомышечные, бета-клетки поджелудочной железы и эндотелиоциты [98, 108].

Для исследования ионных каналов в возбудимых тканях применяются разнообразные методы: электрофизиологические, биохимические, фармакологические, генетические и др. В монографии представлены литературные данные и результаты собственных исследований, касающиеся изменения функциональной активности АТФ-чувствительных и кальцием активируемых калиевых каналов большой проводимости сосудов сердца при физиологических и патологических состояниях.

Термин функциональная активность калиевых каналов, который обозначает не столько состояние электрической проводимости одного канала, сколько дает возможность оценить, каким образом изменение состояния множества каналов (количества открытых каналов, продолжительности их открытия, чувствительности их к агонистам и т.д.) оказывает влияние на сократительную активность гладкомышечной клетки, состояние сосудистой стенки, а следовательно, диаметр кровеносного сосуда, и в конечном итоге, на количество крови, поступающей по данному сосуду к органу в единицу времени. Yusukey Ohya et al. было установлено, что максимальная релаксация или гиперполяризация гладкомышечных клеток не обязательно требует максимального открытия каналов [60, 70]. Следовательно, изменение электрического заряда на мембране более говорит о их влиянии на величину мембранного потенциала, чем на функциональную активность целой клетки. В связи с этим представляет большой интерес изучение влияния блокаторов и активаторов калиевых каналов на интегральный ответ ткани (мышцы сердца, гладкомышечных клеток, клеток поджелудочной железы и др.), а не канала [70].

3.2. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов в регуляции тонуса сосудов сердца

АТФ-чувствительный калиевый канал представляет собой гетеро-октамерный комплекс, включающий две субъединицы: $\text{K}_{\text{IR}}6.X$ ($\text{K}_{\text{IR}}6.1$ или $\text{K}_{\text{IR}}6.2$) субъединицу, формирующую пору, и сульфонилмочевиновый рецептор (SUR) – регуляторную субъединицу, которая является рецептором для сульфонилмочевины [30] (рис. 3.1). $\text{K}_{\text{IR}}6.X$ субъединица [60, 113] относится к семейству каналов внутреннего выпрямления (K_{IR} -калиевым каналам), в состав которых входят два трансмембранных домена. Также

различают три изоформы рецептора сульфонилмочевины: SUR 1 – высокоаффинный рецептор, SUR 2 и SUR 3 – низкоаффинные рецепторы.

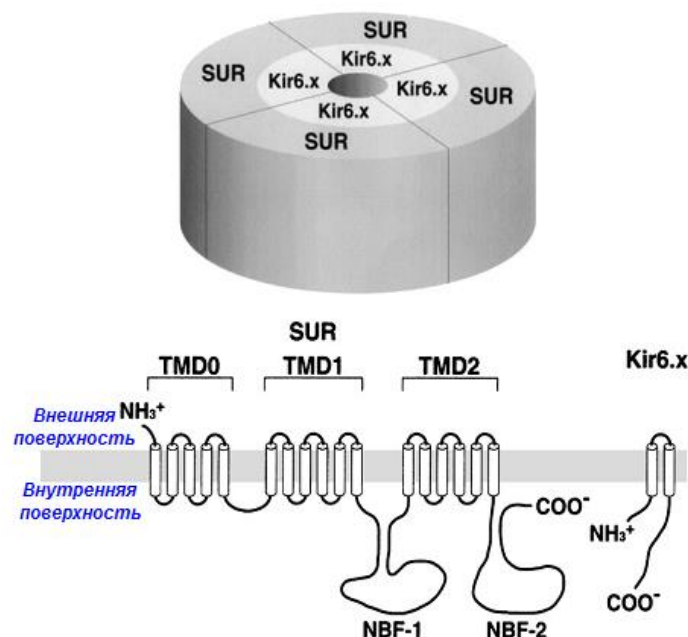


Рисунок 3.1. Структура КАТФ-канала

Структурно калиевые каналы в различных тканях неодинаковы по составляющим субъединицам. Так, в бета-клетках островков поджелудочной железы и глюкозо-чувствительных нейронах гипоталамуса они имеют состав SUR 1/KIR6.2; в мышце сердца – из SUR 2A/KIR6.2 и в гладкомышечных клетках сосудов – SUR 2B/KIR6.1 (или KIR6.2) [119].

Сульфонилмочевинный рецептор имеет три трансмембранных домена TMD0, TMD1 и TMD2 [127]. На цитоплазматической стороне сульфонилмочевинного рецептора имеется два региона, с которыми связываются динуклеотиды NBF1 и NBF2 [127]. NBF-1 и NBF-2 локализованы в виде петель между TMD1 и TMD2 соответственно. SUR1 белок проявляет высокое сродство к производным сульфонилмочевины, таким, как глибенкламид [24]. Показано, что электрофизиологические свойства димера SUR1 и Kir6.2 сходны с таковыми из КАТР-канала бета-клетки поджелудочной железы. Стехиометрия 1:1 достаточна, чтобы сформировать функциональные каналы. Биохимические исследования определили молекулярную массу Kir6.2/SUR1 комплекса, которая соответствовала приблизительно 950 kDa [31].

Связанные с мембраной кардиомиоцитов АТФ-чувствительные калиевые каналы (КАТФ-каналы) впервые были описаны Noma [34]. Данные каналы находятся под контролем метаболического состояния клетки и избирательно ингибируются производными сульфонилмочевины, такими, как глибенкламид, который широко используется в лечении сахарного диабета второго типа.

Активация КАТФ-каналов приводит к гиперполяризации мембраны, которая сопровождается вазорелаксацией [34]. Оказывая влияние на мембранный потенциал клетки, КАТФ-каналы обеспечивают взаимосвязь интенсивности клеточного метаболизма с тонусом сосудов. Сосудистый тонус мелких артерий и, таким образом, кровоснабжение различных органов регулируется при участии АТФ-чувствительных калиевых каналов [33]. При отсутствии КАТФ-каналов в гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах повышается чувствительность коронарных сосудов к эргоновину (феномен Принцметала) и развивается электрическая нестабильность миокарда (фибрилляция сердца при повторных физических нагрузках) [32, 93]. В. Malester et al. (2007) исследовали свойства

коронарных сосудов мыши, у которых отсутствовали КАТФ-каналы только в эндотелиоцитах. Ими было установлено, что в этих условиях значительно увеличивается синтез и высвобождение эндотелина I, увеличивается тонус сосудов сердца и снижается коронарный кровоток [126].

Эксперименты, выполненные на коронарных сосудах различных видов животных, с использованием блокатора КАТФ-каналов глибенкламида показали, что данные каналы принимают участие в регуляции базального сосудистого тонуса [18, 108], возникновении реактивной гиперемии [18, 28], гипоксической вазодилатации и расширении сосудов, вызываемой аденозином [108]. Клинические исследования продемонстрировали роль КАТФ-каналов в регуляции тонуса периферических сосудов человека [36, 58].

Важная роль КАТФ-каналов в регуляции кровяного давления была продемонстрирована в экспериментах на животных, у которых отсутствовали гены, ответственные за экспрессию KIR6.1 и SUR2 в гладкомышечных клетках коронарных сосудов. Такие животные были предрасположены к коронарному спазму и внезапной смерти [93]. У мышей, с отсутствующим геном SUR2, отмечалось сужение коронарных артерий и повышенное артериальное давление [55].

Дальнейшие доказательства роли КАТФ-каналов в регуляции тонуса сосудов были продемонстрированы на модели животных с гипертонией, у которых наблюдалось значительное изменение в структуре канала и уменьшении их количества на мембране гладкомышечной клетки. Такие изменения сопровождались нарушением реактивности сосудов [47, 121].

КАТФ-каналы не только способны отвечать на изменения внутриклеточного метаболизма, но и также могут активироваться при воздействии на них различных эндогенных медиаторов, таких как простагландины, агонисты бета-адренорецепторов, аденозин [100, 125].

Роль КАТФ-каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов была продемонстрирована при патологических (сахарный диабет, иммобилизационный стресс) и физиологических состояниях (адаптация к стрессу) на изолированном сердце.

В экспериментах на изолированном по Лангендорфу сердцах крыс было установлено, что стресс и экспериментальный сахарный диабет приводит к снижению функциональной активности КАТФ-каналов эндотелиальных и гладкомышечных клетках коронарных сосудов. Постстрессорное угнетение функциональной активности КАТФ-каналов, по-видимому, является следствием их повреждения, которое проявляется нарушением их чувствительности к фармакологическим (пинацидилу) и эндогенным (аденозину) активаторам [10], блокатору глибенкламиду, увеличивает чувствительность к коронароконстрикторам (метилэргоновину) [11] и делает зависимой активность КАТФ-каналов от функционального состояния эндотелиоцитов коронарных сосудов [18].

Постстрессорное снижение функциональной активности калиевых каналов может быть связано с нарушением функции субъединиц, входящих в их состав. Белковые молекулы, образующие субъединицы исследуемых каналов, содержат сульфгидрильные группы, от состояния которых зависит функциональная активность канала. Более того, снижение активности калиевых каналов гладкомышечных клеток может быть связано с тем, что при иммобилизационном стрессе происходит активация перекисного окисления липидов, снижается общая антиоксидантная активность плазмы крови и соотношение GSH и GSSG изменяется в сторону накопления GSSG [3, 135]. Известно, что при изменении соотношения окисленного и восстановленного глутатиона (GSSG/GSH) характер активности различных ферментов в клетках меняется, в том числе изменяются и факторы транскрипции. Иммобилизационный стресс приводит к значительному снижению активности фермента креатинфосфокиназы, которая с внутренней стороны мембраны клетки структурно связана с КАТФ-каналом [45]. В физиологических условиях креатинфосфокиназа катализирует образование АТФ из креатинфосфата и АДФ, тем самым поддерживая высокое соотношение АТФ/АДФ около самого канала. Высокое

соотношение АТФ/АДФ и обеспечивает то, что канал находится в закрытом состоянии. При снижении активности креатинфосфокиназы вблизи канала снижается образования АТФ и накапливается АДФ, активирующий канал. В то же время, в первые 6 часов стрессорного повреждения сердца, в первую очередь, нарушается окисление НАД-зависимых субстратов в митохондриях сердца [13]. Это позволяет предположить, что при этом состоянии должно содержаться избыточное количество АДФ, способное вызвать функциональную активацию K_{ATP} -каналов. Однако Голубевой Л.Ю. и Меерсоном Ф.З. в 1986 году было установлено отсутствие влияния 6-часового иммобилизационного стресса на содержание адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) и выраженное под его влиянием снижение на 30% в миокарде концентрации креатинфосфата [5]. Таким образом, при 6-часовой иммобилизации снижается количество креатинфосфата, не изменяется концентрация АТФ и АДФ и наблюдается угнетение функциональной активности K_{ATP} -каналов. В данном случае можно говорить о разобщении регуляторных влияний и активности K_{ATP} -каналов. Подобное состояние каналов можно охарактеризовать как постстрессорную каналопатию [29].

Однако можно предположить и то, что вызываемое стрессом снижение функциональной активности сарколемальных K_{ATP} -каналов обладает и положительным эффектом. В работе G. Milano et al. в 2004 г. было показано, что введение глибенкламида, вызывающего деполяризацию мембраны, и активатора митохондриальных K_{ATP} -каналов диазоксидом независимо друг от друга значительно улучшают сократительную функцию миокарда при хронической гипоксии [94]. Это свидетельствовало о том, что уменьшение потери K^+ из цитоплазмы и увеличение его вхождения в митохондрии обладает положительным эффектом, выражающимся в защите сердца от повреждений, вызываемых гипоксией. Следовательно, вызываемое стрессом снижение функциональной активности сарколемальных АТФ-чувствительных калиевых каналов, по-видимому, имеет важный положительный эффект для сохранения внутриклеточного K^+ , создавая предпосылки для его проникновения внутрь митохондрий и формирования защитного эффекта адаптации в гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах.

Иная картина наблюдается во время адаптирующих коротких стрессорных воздействий. В условиях интактного эндотелия так же, как и при стрессе, наблюдается снижение функциональной активности K_{ATP} -каналов, однако чувствительность к активаторам при этом не изменяется и не наблюдается предрасположенности к спазму коронарных сосудов [10]. Подобное явление можно расценить как снижение функциональной активности АТФ-чувствительных калиевых каналов, играющих важную роль в формировании защитного эффекта адаптации короткими стрессорными воздействиями [4]. Таким образом, сарколемальные K_{ATP} -каналы имеют важное значение в формировании адаптационного эффекта. Можно предположить, что повторные взрывы образования активных форм кислорода во время коротких стрессорных воздействий могут вызывать блокаду сарколемальных K_{ATP} -каналов, а посредством образующейся при этом перекиси водорода привести к активации митохондриальных K_{ATP} -каналов и защитить клетку от повреждения [61, 66].

Важная роль сарколемальных K_{ATP} -каналов в формировании феномена preconditionирования была продемонстрирована в работах Masashi Suzuki [116, 120].

Калиевые каналы представляют собой не только связующее звено в защите против ишемического повреждения, они активируются и при гипоксии, обеспечивая ингибирование активности метаболических процессов, а также защиту сердца и мозга [118, 132]. Активатором данных каналов при гипоксии может быть аденозин. При ишемии и гипоксии он накапливается в сердце, мозге, почках, приводя к активации протеинкиназы С. Она, в свою очередь, фосфорилируя Kir 6.2 субъединицу K_{ATP} -каналов, активирует их. При активации K_{ATP} -каналов в кардиомиоцитах и нейронах во время ишемии сохраняется энергия и не наблюдается накопление ионов Ca^{2+} . Активированные калиевые каналы уменьшают время потенциала действия кардиомиоцита, препятствуют потере ионов K^+ и

предотвращают риск развития аритмий [80]. Активность канала главным образом зависит от их количества. Умеренное открытие калиевых каналов во время стресса защищает от повреждения, а избыточная их активация приводит к нежелательным последствиям. Активация протеинкиназы С во время стрессорного воздействия приводит к двукратному уменьшению числа калиевых каналов на клеточной мембране кардиомиоцитов и нейронов путем их интернализации [35, 80]. Предпосылкой для интернализации является активация G-белков с последующим фосфорилированием активированных рецепторов [128].

В работе Yuzo Asita и соавторов было показано, что физические тренировки, активируя симпатический отдел вегетативной нервной системы, приводят к изменению редокс-состояния клеток с последующим образованием монооксида азота и защищают сердце от ишемии/реперфузионных повреждений. Кроме того, активация симпатического отдела вегетативной нервной системы имеет важное значение в формировании защитного эффекта физической тренировки [22]. В плане обсуждения роли АТФ-чувствительных каналов в формировании протекторного эффекта во время адаптации к физическим нагрузкам большой интерес представляют работы Тодосийчука и Кузнецова, свидетельствующие о повышении толерантности миокарда к ишемии при повторных велоэргометрических пробах с интервалом в 15 минут [19, 78].

3.3. Роль BK_{Ca} -каналов в регуляции тонуса сосудов сердца

В структуру кальций-зависимого калиевого канала входит четыре α - и четыре β -субъединицы (рис.3.2). Субъединицей, которая определяет функциональную активность BK_{Ca} -канала, определена β -субъединица. Она состоит из 11 гидрофобных областей (S0-S10), наиболее важные из которых являются трансмембранные домены (S0-S6), которые расположены с внешней стороны поры канала. Другие домены (S7-S10) расположены в цитоплазме. Трансмембранные домены внешней стороны мембраны имеют концевую NH_2 -группу. Домены, расположенные в цитоплазме, имеют на конце COOH -группу [42, 67]. S4-домен, включает в себя аминокислоты, имеющие положительный заряд и, возможно, может быть рассмотрен как рецептор канала. Внутреннюю стенку канала формируют α -субъединицы. Из литературных данных известно, что именно α -субъединица наиболее чувствительна к колебаниям концентрации внутриклеточного кальция. Такое свойство исследователи связывают с так называемым участком «кальций Bowl», который расположен в хвостовой области белка [42].

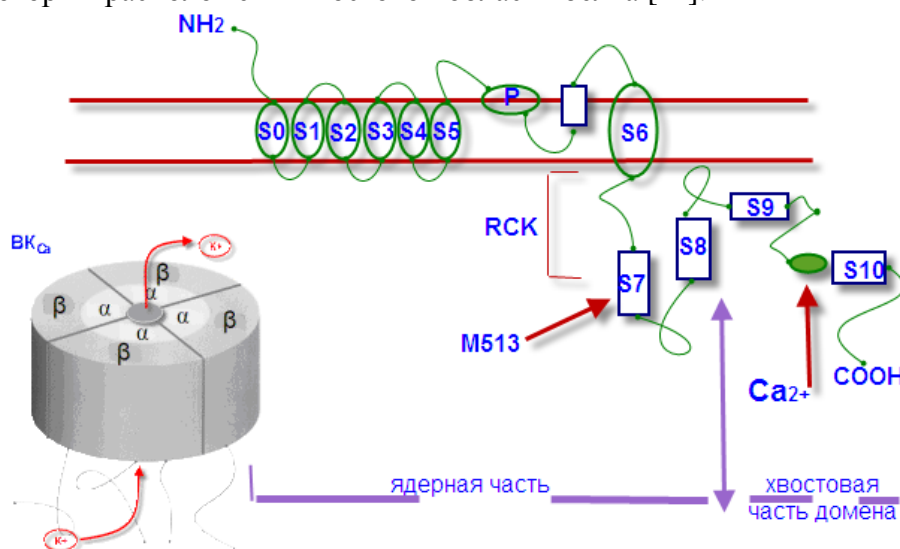


Рисунок 3.2. Структура BK_{Ca} -калийного канала

BK_{Ca} -каналы обнаружены в различных клетках: в лимфоцитах [42], эритроцитах [8], нейронах центральной нервной системы [2], гладкомышечных клетках мочевого пузыря [1]. В сердечно-сосудистой системе кальцием активируемые калиевые каналы

экспрессируются преимущественно в гладкомышечных клетках сосудов. Недавние исследования продемонстрировали, что BK_{Ca} -каналы расположены в митохондриях кардиомиоцитов [79, 115]. Локализация BK_{Ca} -каналов в эндотелиальных клетках является спорным и подлежит дальнейшему изучению [52, 134]. В оставшейся части монографии основное внимание будет уделено BK_{Ca} -каналам, которые расположены в гладкомышечных клетках коронарных сосудов и кардиомиоцитах.

Именно внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} определяет функциональную активность BK_{Ca} -каналов. [46]. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} сопровождается открытием BK_{Ca} -канала и выходом ионов K^+ из клетки, в результате чего наблюдается гиперполяризация ее мембраны (рис. 3.3). В свою очередь, это ведет к инактивации потенциалзависимых Ca^{2+} - каналов и релаксации гладких миоцитов. Следовательно, кальций-зависимые калиевые каналы путем инактивации кальциевых каналов и ограничения количества входящего в клетку ионов Ca^{2+} способны ослаблять сокращение гладкомышечных клеток сосудов, тем самым способствовать снижению их тонуса [46].

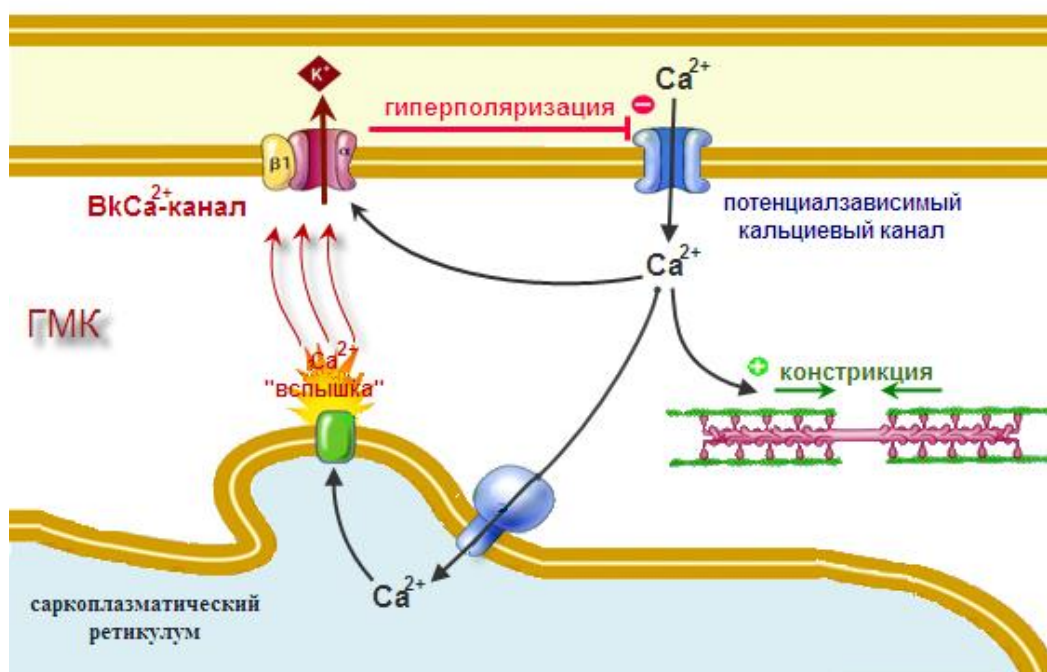


Рисунок 3.3. Механизм расслабления гладкомышечных клеток

BK_{Ca} -каналы гладкомышечных клеток коронарных сосудов не обладают базальной активностью и почти не активны при низких уровнях перфузионного давления. Свое действие они проявляют только при перфузионном давлении 80 мм рт. ст., т.е. в условиях, когда наблюдается выраженная сократительная реакция гладкомышечных клеток сосудов сердца в ответ на их растяжение внутрисосудистым давлением (в области ауторегуляции коронарного потока). Это вполне понятно, если учесть, что в этих условиях значительно возрастает внутриклеточная концентрация ионов кальция – основного активатора BK_{Ca} -каналов. Данный факт позволяет предположить, что эндотелий как модулятор тонуса сосудов сердца, может оказывать выраженное влияние на активность BK_{Ca} -каналов и их роль в ауторегуляции коронарного потока.

Функциональная активность BK -каналов в сосудистой системе модулируются, главным образом, синтезом веществ в самом организме, таких как ангиотензин II, высоким содержанием глюкозы или арахидоновой кислоты, характерных для окислительного стресса (рис. 3.4) [41, 71, 89].

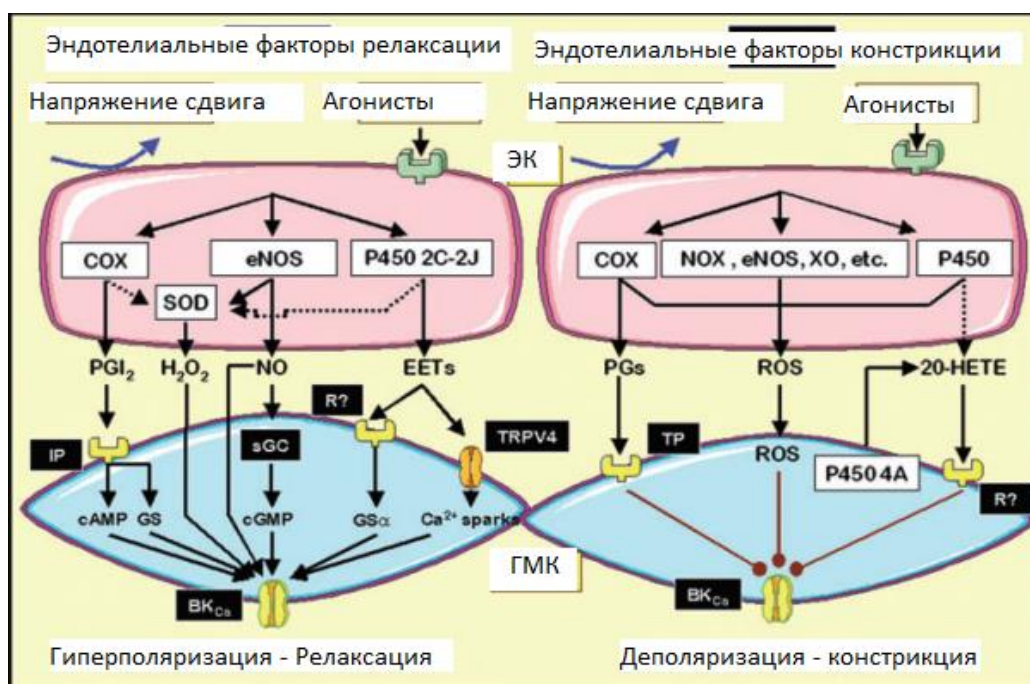


Рисунок 3.4. Эндотелиальные вазоактивные факторы и активность BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток сосудов. 20-НЕТЕ, 20-гидроксиэтоксисатетраеновая кислота; BK_{Ca} , активированный кальцием калиевые каналы большой проводимости; цАМФ, монофосфат циклического аденозина; цГМФ, монофосфат циклического гуанозина; COX, циклооксигеназа; ЭК, эндотелиальная клетка; EET, эпоксистоксатриеновые кислоты; eNOS, эндотелиальная синтаза оксида азота; GS, G-белок S; GS α , субъединица G-белка S; H_2O_2 , перекись водорода; IP, рецептор простого рецептора; NO, оксид азота; NOX, NADPH-оксидаза; P450, цитохром P450 монооксигеназы; PGI $_2$, простаглицлин; R?, предполагаемый рецептор; ROS, реактивные формы кислорода; sGC, растворимая гуанилатциклаза; СОД, супероксиддисмутаза; TP, рецептор тромбоксана / эндопероксида; TRPV4, канал потенциального рецептора ванилида 4; ГМК, гладкомышечные клетки сосудов; XO, ксантиноксидазы

Ангиотензин II стимулирует РКС-зависимый сигнальный путь, что приводит как к нарушению функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток, так и к их интернализации и, как следствие, к вазоконстрикции [87].

Хроническое увеличение уровня глюкозы в крови в организме сопровождается оксидативным стрессом и накоплением реактивных форм кислорода. В частности, супероксидный радикал может приводить к окислению дисульфидсодержащих белков, в большом количестве расположенных в BK -каналах и нарушению экспрессии гена hSlo, который кодирует β -субъединицу BK -каналов может лежать в основе нарушения гиперполяризации мембраны гладких миоцитов сосудов. [107].

В коронарных гладкомышечных клетках BK_{Ca} -каналы активируются метаболитами арахидоновой кислоты, в частности простаглицлином 2. У крыс, страдающих диабетическим ожирением, наблюдалось снижение активности BK_{Ca} -каналов, обусловленное уменьшением производства простаглицлина 2 за счет снижения активности PGI 2-синтазы. Lu и др. показали, что высокий уровень глюкозы снижает плотность и кинетику канала за счет увеличения свободнорадикального окисления. В другом исследовании продемонстрирована роль кавеол в ингибировании BK_{Ca} -каналов свободными радикалами, а также фосфорилированием и нитрозилированием тирозиновых остатков канала [90].

Кроме ионов кальция эти каналы могут активироваться сосудорасширяющими веществами или физическими факторами вроде внутрисосудистого давления, действующими через цГМФ и цАМФ-зависимые механизмы [23, 104], а также частотой кальциевых залпов из саркоплазматического ретикулума гладких миоцитов (рис. 3.4) [76,

77]. Стимуляция β_3 -адренорецепторов приводит к дилатации гладкомышечных клеток грудной аорты крыс. Вазодилатация опосредована активацией VK_{Ca} -каналов через NOS и PKA сигнальные пути [88].

Установлено, что эстрогены и тестостерон способны увеличивать функциональную активность VK -каналов. Высокие концентрации эстрогенов активируют канал либо опосредованно, увеличивая концентрацию NO, либо непосредственно контактируя с β -субъединицей канала. Тестостерон, вероятно, увеличивая внутриклеточное содержание цГМФ может способствовать вазодилатации [15, 57, 96, 122, 130].

Фактор роста фибробластов, принимающий участие в пролиферации клеток, повышает функциональную активность VK_{Ca} -каналов. Было показано, что ранняя активация VK -каналов фактором роста фибробластов в эндотелиальных клетках, опосредуется через G-белок-зависимые механизмы, напротив, более поздний эффект обусловлен тирозинкиназным сигнальным путем [38].

Многочисленные исследования показали, что кроме монооксида азота и простагличина в эндотелийзависимом расслаблении артериальных сосудов принимает участие неизвестное вещество, которое было названо как эндотелиальный гиперполяризующий фактор.

Два главных факта указывают на роль EDHF-опосредуемого ответа в регуляции сосудистой системы. Во-первых, у анестезированных крыс блокада NO-синтазы увеличивает базальную проводимость в мезентериальном сосудистом ложе и сосудах нижней половины туловища. Сочетанное локальное применение харибдотоксина+апамина не оказывало влияние ни в одном сосудистом ложе. Однако вызываемое ацетилхолином увеличение проводимости было чувствительно как к блокатору NO-синтазы, так и к комбинации харибдотоксина+апамина (но не ибериотоксину). Это указывает на то, что EDHF-опосредуемый ответ вносит небольшой вклад в базальную проводимость [54, 59]. Во-вторых, в изолированных мезентериальных артериях крысы, находящихся в условиях повышенной экспрессии SKCa (X3), чувствительность к фенилэфрину снижается, по сравнению с животными с нормальным содержанием калиевых каналов. Этот эффект блокировался комбинацией харибдотоксина+апамин. У этих животных диаметр кровеносных сосудов увеличивался, а плотность артерий становилась больше. Подавление повышенной экспрессии калиевых каналов доксициклином приводит к увеличению кровяного давления и выраженному снижению абсолютного значения мембранного потенциала гладкомышечных клеток [50].

По определению EDHF - это вещество, синтезируемое в эндотелиоцитах, обладающее способностью гиперполяризовать мембрану гладкомышечных клеток и тем самым предотвращает открытие потенциал-зависимых кальциевых каналов и способствует вазодилатации.

Гипотеза, что EDHF, произведенный в некоторых артериях может быть производным метаболитом арахидоновой кислоты, была первоначально разработана на основе экспериментов, которые показали, что применение экзогенной арахидоновой кислоты на изолированные сосудистые сегменты вызвало расслабление. Кроме того, во многих артериях, EDHF-опосредованные реакции были уменьшены веществами, которые ингибируют фосфолипазу A2, поэтому и липоксигеназа и производные сосудистого цитохрома P450 стали вероятными кандидатами на роль эндотелийзависимого вазорелаксирующего фактора. Другие методы кроме фармакологического ингибирования цитохрома P450 значительно усилили гипотезу, что активность цитохрома P450 является составным компонентом EDHF-зависимой вазодилатации. RT-ПЦР, Western-blot и иммунофлуоресцентный анализ показали, что коронарные эндотелиальные клетки экспрессируют цитохром P450 эпоксигеназу, включая цитохром 2C8, цитохром 2C9 и цитохром 2J2.

При различных заболеваниях сосудов наблюдается снижение EDHF-опосредуемых ответов. Эксперименты на изолированных артериях человека, полученных из биоптатов

миометрия, показали, что у беременных женщин с преэклампсией имеются специфические нарушения EDHF-опосредуемой вазодилатации [59]. Ухудшение EDHF-опосредуемого ответа также ухудшается при старении [51], артериальной гипертензии [103], хронической сердечной недостаточности [133], сахарном диабете [69], сепсисе [56], атеросклерозе [103]. Более того, существуют доказательства улучшения EDHF-опосредуемого ответа благодаря введению крысам с удаленными яичниками эстрогенов, также прием блокаторов ангиотензинпревращающего фермента, омега-3-полиненасыщенных жирных кислот, производных полифенола приводит к улучшению EDHF-опосредуемого ответа. В экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности на крысах было показано снижение EDHF-опосредуемой вазодилатации [111].

Имеются данные о том, что монооксид азота и EDHF находятся в реципрокной зависимости. Так полная блокада синтеза NO стимулирует активность эндотелиального фактора гиперполяризации [65, 109].

Считается, что механизм вазодилатации EDHF связан с активацией калиевых каналов гладкомышечных клеток, а также SK и IK каналов эндотелиальных клеток, что вызывает гиперполяризацию гладких миоцитов и расслабление сосудистой стенки [63]. Недавние исследования показали, что эндотелиальный фактор гиперполяризации может активировать BK-каналы, расположенные в гладкомышечных клетках сосудов [65]. Исследования на грудной артерии человека продемонстрировали, что селективный ингибитор кальцием активируемых калиевых каналов ибериотоксин, устранял EDHF-опосредуемую вазодилатацию. Эти данные позволили ученым сформулировать гипотезу, что EDHF можно рассматривать, как 11,12 эпоксиэйкотриеновую кислоту, которая синтезируется из арахидоновой кислоты. Это вещество, взаимодействуя с рецепторами, активирует BK-каналы гладких миоцитов сосудов. Этот факт указывает на то, что одной из точек приложения EDHF является активация BK_{Ca} -калиевых каналов гладкомышечных клеток сосудов. В свою очередь, активация калиевых каналов сопровождается гиперполяризацией мембраны гладкомышечных клеток сосудов, что приводит к вазодилатации ее стенки [20, 38].

BK_{Ca} -каналы, расположенные в гладкомышечных клетках сосудистой стенки принимают участие в регуляции сосудистого тонуса, как при физиологических, так и патологических состояниях [42, 105]. Вполне вероятно, что они могут принимать участие в реагировании стенки сосуда сердца на увеличение при стрессе концентрации в крови таких вазоактивных субстанций, как катехоламины, продукты свободнорадикального окисления [12, 14], цитокины [129], ангиотензин II [25, 27] и монооксид азота [17]. Более того, BK_{Ca} -каналы редокс-чувствительны [3]. Белковые молекулы, их образующие содержат много сульфгидрильных групп, окисление которых существенно изменяет функциональную активность каналов.

При нарушении экспрессии гена, который кодирует $\beta 1$ -субъединицу кальций-зависимых калиевых каналов, наблюдается повышение тонуса сосудов, и, как следствие, развитие артериальной гипертензии. [123]. Установлено, что этанол в высоких концентрациях блокирует BK_{Ca} -каналы, и, вероятно, становится причиной развития стойкой артериальной гипертензии при алкоголизме [131]. Одной из причин сосудистых «катастроф» при сахарном диабете является снижение функциональной активности BK_{Ca} -каналов [107], напротив, увеличение активности этих каналов при геморрагическом шоке сопровождается гипореактивностью сосудов [91]. Одной из причин нарушения тонуса сосудов сердца при метаболическом синдроме является, вызванная, увеличением концентрации ионов Ca^{2+} внутри гладкомышечных клеток, активация кальциевых каналов L-типа и, как следствие, повышение активности BK_{Ca} -каналов [72]. Сокращение калиевого тока через BK_{Ca} -каналы рассматривают как ключевой молекулярный механизм сенситизации устойчивости сосудов к вазоконстрикции у мышей с систолической сердечной недостаточностью [110]. При старении организма наблюдается снижение

активности VK_{Ca} -каналов, что в свою очередь приводит к увеличению тонуса сосудов [48]. В настоящее время существует мнение, что феномен прекондиционирования связан с активацией VK_{Ca} -каналов. Исследования на изолированном сердце крысы показали, что кардиозащита, вызванная прекондиционированием, устранялась после блокады VK_{Ca} -каналов паксиллином [101, 102]. Активация VK_{Ca} -каналов NS-1619 вызывала кардиозащиту так же, как эффект прекондиционирования или активация АТФ-чувствительных калиевых каналов диазоксидом [53, 101, 102]. Эти наблюдения дают возможность предположить, что VK_{Ca} -каналы вовлечены в кардиозащиту от ишемических инсультов [68, 101, 102]. Нами было показано, что дибазол, кроме сосудорасширяющего, спазмолитического и гипотензивного и иммуностимулирующего эффектов, усиливает эндотелийзависимую дилатацию кольца аорты крысы, а также повышает чувствительность эндотелиоцитов к ацетилхолину артериальных сосудов [6]. Это дает основание говорить о дибазоле как о средстве, модулирующем эндотелийзависимое расслабление. Дибазол усиливает не только высвобождение монооксида азота, но и действует на другие механизмы эндотелийзависимой вазодилатации. Сосудорасширяющий эффект NO частично опосредован кальцийактивируемыми калиевыми каналами большой проводимости (VK_{Ca} -каналами) гладкомышечных клеток сосудов [16]. Также было продемонстрировано, что производное бензимидазола – 2-этилтиобензимидазола гидробромид (2-ЭТГ) активирует VK_{Ca} -каналы и оказывает вазодилататорный эффект на гладкомышечные клетки сосудов аорты крыс [9].

Влияние экзогенных факторов на функциональную активность VK_{Ca} -каналов.

Для изучения кальций-зависимых калиевых каналов могут быть использованы как активаторы, так и вещества инактивирующие данные каналы. В качестве блокаторов VK -каналов используют плаксиллин, ибериотоксин и харибдотоксин (токсин скорпиона), вещества относящиеся к ряду алкалоидов. [92]. Ибериотоксин – это белок, состоящий из 37 аминокислотных остатков, выделенный из яда скорпиона *Vuthus tamulus* и обладающий высокой аффинностью к VK_{Ca} -каналам [92]. Так добавление в перфузионный раствор блокатора VK -каналов ибериотоксина сопровождалось увеличением тонуса сосуда. Считают, что инактивация связана с закрытием поры VK -канала. Этот процесс происходит из-за взаимодействия карбоксилатов, имеющие отрицательный заряд, с аминокислотными остатками ибериотоксина, имеющие положительный заряд. [43, 92]. Тетраэтиламмоний в концентрации 1 Мм также является блокатором VK -каналов. [40]. Кетамин, также инактивирует VK -каналы гладких миоцитов церебральных артерий кроликов. [81]. Этанол в высоких концентрациях также обладает блокирующим свойством [131].

Бензимидазолон, NS-1619, NS-1608 относят к классу веществ, способных активировать VK -каналы. Эксперименты, выполненные на сосудах мочевого пузыря с использованием NS-1619 продемонстрировали, что истощение ионов Ca^{2+} , расположенных в саркоплазматическом ретикулуме клетки устраняет активацию кальцием активируемых калиевых каналов. Исследователи предполагают, что механизм действия NS-1619 во многом обусловлен высвобождением ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. [39, 43].

Выявленные свойства селективных активаторов VK -каналов создают перспективу использования этих препаратов для профилактики и лечения сосудистых «катастроф» и нейродегенеративных заболеваний.

Постстрессорное нарушение функциональной активности VK_{Ca} -каналов.

Функциональную активность VK_{Ca} -каналов изучали на изолированном сердце крысы с применением блокатора тетраэтиламмония 1 мМ [62, 98]. Нами выбрана доза тетраэтиламмония 1мМ, как селективно блокирующая именно активируемые кальцием калиевые каналы большой проводимости расположенные в гладкомышечных клетках.

Вклад калиевых каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта тетраэтиламмония, выраженного в %, от

исходного кровотока (чем более активны каналы, тем больше влияние блокатора, и наоборот).

В экспериментах на изолированных по Лангендорфу сердцах и изолированных кольцах аорты было установлено, что иммобилизационный стресс и экспериментальный сахарный диабет, приводили к снижению функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток сосудов [85]. Данные изменения сопровождались снижением чувствительности к используемому нами блокатору BK_{Ca} -каналов (тетраэтиламмоний 1 мМ) и активатору NS-1619. Это дало возможность предположить, что в процессе иммобилизационного стресса и экспериментального сахарного диабета развивается постстрессорная каналопатия. Наши данные согласуются с результатами других исследователей, которые в опытах на инсулинрезистентных крысах, выявили уменьшение калиевого тока, макроскопическое снижение плотности каналов и чувствительности к блокаторам BK_{Ca} -каналов (тетраэтиламмоний и ибериотоксину). Действие активатора каналов NS-1619 было эффективнее в контроле, чем у инсулинорезистентных крыс [107].

Следовательно, можно заключить, что иммобилизационный стресс сопровождается неспецифическим подавлением активности основных групп калиевых каналов (BK_{Ca} - и K_{ATP} -каналов), участвующих в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток сосудов сердца, что рассматривается нами как постстрессорная каналопатия.

Каналопатии, вызванные мутациями аминокислотных остатков канала, могут привести к нарушению функций клеток и органов. Каналопатиям подвержены все виды каналов и, следовательно, могут быть причиной множества расстройств, например, таких как эпилепсия, инсульт, мозжечковая атаксия, потеря слуха, аутизм, астма умственная отсталость, миотония, болезни сердца, гипертония, муковисцидоз, гипермоторика мочевого пузыря или желудка, эректильная дисфункция и т.д. [44, 74, 83, 86, 95, 97].

ЛИТЕРАТУРА

1. Активаторы калиевых каналов – новый класс антиангинальных, кардиопротекторных и гипотензивных средств / О.И. Шушляпин [и др.] // Кардиология. – 1994. – № 6. – С. 143–147
2. Белугин, С.Н. Кальцийзависимые калиевые токи нейронов одиночного ядра при почечной гипертензии / С.Н. Белугин // Здоровоохранение. – 2009. – №2. – С. 20–25.
3. Влияние адаптации к коротким стрессорным воздействиям на редокс-состояние клеток после иммобилизационного стресса / Майорова С.С., Лазуко С.С., Моисеев Д.В., Поволоцкий Е.А., Аксенов П.А., Федукевич А.Ю., Солодков А.П. // Актуальные вопросы современной медицины и фармации (материалы 61 итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых университета, посвященной 75-летию его образования, 23-24 апреля). – Витебск. – 2009. – С. 216-219
4. Возможность профилактики стрессорных изменений коронарного кровообращения и сократительной функции миокарда зависит от состояния функциональной активности КАТФ-каналов / С.С. Лазуко // «Вестник Витебского государственного медицинского университета». – 2007. – Т.6, №3. – С.20-26.
5. Голубева, Л. Ю. Снижение активности креатинфосфокиназы в сердечной мышце при стрессе / Л. Ю. Голубева, Ф. З. Меерсон // Кардиология. – 1986. – Т. 26, № 5. – С. 108-109.
6. Дибазол как эндотелийзависимое вазодилатирующее средство / Солодков А.П., Майорова С.С., Подпалов В.П., Лазуко С.С., Хишова О.М., Постраш Я.В. // Журнал «Рецепт». – 2008. – Т. 59, №3. – С. 80-84.
7. Зефиоров, А.Л, Ситдикова, Г.Ф. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / монография, Казань: Арт-кафе. – 2010. – 270 с.
8. Изучение природы гиперполяризационного ответа эритроцитов, индуцированного системой аскорбат-феназинметосульфат / А.В. Ситожевский [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 4. – С. 461–469.
9. Лазуко С.С. 2-этилтиобензимидазола гидробромид активирует ВКСа-каналы гладкомышечных клеток аорты крыс. Вестник ВГМУ. – 2014. – Т.13, №4. – С. 38-44
10. Лазуко, С.С. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям предупреждает постстрессорное нарушение чувствительности коронарных сосудов к активаторам КАТФ-каналов / С.С. Лазуко, А.П. Солодков // «Вестник Витебского государственного медицинского университета». – 2007. – Т.6, № 2. – С. 29-38.
11. Лазуко, С.С. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям предупреждает увеличение чувствительности сосудов сердца к метилэргоновину после 6-ти часовой иммобилизации / С.С. Лазуко Ю.В. Карпий, А.В. Славецкая // Актуальные вопросы современной медицины и фармации (59-ая итоговая научно-практическая конференция студентов и молодых ученых, 26-27 апреля). – Витебск, 2007. – С. 180-182.
12. Лазуко, С.С. Сравнительная характеристика постстрессорных изменений функциональной активности КАТФ- и ВК-каналов коронарных сосудов // С.С. Лазуко, С.С. Майорова, А.П. Солодков // Журнал «Вестник Витебского государственного медицинского университета». – Витебск. – 2007. –Т.6, №2. – С.39-47.
13. Малышев, В. В. Функциональное состояние митохондрий сердца в динамике эмоционально-болевого стресса / В. В. Малышев, В. И. Лифантьев, Ф. З. Меерсон // Кардиология. – 1982. – Т. 22, № 6. – С. 113-115.
14. Меерсон, Ф.З. Постстрессорная активация синтеза нуклеиновых кислот и белков и ее роль в адаптационных реакциях организма / Меерсон, Ф.З. Павлова В. И., Сухих Т.Т. // Патол. физиол. и эксперим терапия. – 1982. – Т. 5. – С. 3-17.
15. Полиморфизм генов ангиотензинпревращающего фермента, ангиотензина II, NO-синтазы, эстрогеновых рецепторов и гендерные различия в их влиянии на развитие сердечно-сосудистой патологии / С.Н. Терещенко [и др.] // Кардиология. – 2009. – № 4. – С. 58–62.

16. Скринаус, С.С. Влияние дибазола на функциональную активность активируемых кальцием калиевых каналов большой проводимости (BKCa) гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты / С.С. Скринаус, С.С. Лазуко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – № 3. – С. 28-32.
17. Солодков, А.П. Монооксид азота и функциональная активность кальцийактивируемых калиевых каналов большой проводимости коронарных сосудов при ограничении двигательной активности крыс / А.П. Солодков, С.С. Майорова, С.С. Лазуко // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – Санкт-Петербург. – 2009. – Т.95, № 7. – С. 736-749.
18. Солодков, А.П. Участие АТФ-чувствительных калиевых каналов ауторегуляции коронарного кровотока при ограничении двигательной активности крыс / А.П. Солодков, С.С. Лазуко // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 10. – С.1149-1161
19. Тодосийчук, В. В. Влияние дипиридамола на феномен ишемического прекондиционирования у больных ишемической болезнью сердца при проведении парных велоэргометров. / В. В. Тодосийчук, В. А. Кузнецов // Кардиология. – 2005. – №9. – С. 23-25.
20. 14, 15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic Acid A Selective Epoxyeicosatrienoic Acid Antagonist That Inhibits Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Relaxation in Coronary Arteries / M. Gauthier [et al.] // Circ. Res. – 2002. – Vol. 90. – P. 1028–1036.
21. Acetic acid opens large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in guinea pig detrusor smooth muscle cells / Ghatta S. [et al.] // Eur J Pharmacol. – 2007. – Vol. 563, №1-3. – P. 203-208.
22. Acita, Y. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. / Acita Y. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 292. – P. H2052-2059.
23. ACPA and JWH-133 modulate the vascular tone of superior mesenteric arteries through cannabinoid receptors, BKCa channels, and nitric oxide dependent mechanisms / E. López-Dyck [et al.] // Pharmacol Rep. – 2017. – Vol. 69, №6. – P. 1131-1139. doi: 10.1016/j.pharep.2017.06.011.
24. Aguilar-Bryan, L. Of mice and men: KATP channels and insulin secretion / L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, M. Nakazaki // Recent Prog. Horm. Res. – 2001. – Vol. 56. – P. 47-68.
25. Aguilera, G. The renin angiotensin system and the stress response / G. Aguilera, A. Kiss, Luo Xun, Bulbin-Sunar Akbasak // Stress. Basic mechanisms and clinical implications. Annals New York Academy of Sciences. New York. – 1995. – P.173-186
26. Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure / M.S. Taylor [et al.] // Circ. Res. – 2003. – Vol. 93. – P. 124-131.
27. Angiotensin II stimulates internalization and degradation of arterial myocyte plasma membrane BK channels to induce vasoconstriction / M.D. Leo [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2015. – Vol. 309, №6. – P. C392-C402.
28. Anne R. Crecelius, Jennifer C. Richards, Gary J. Luckasen, Dennis G. Larson, Frank A. Dinunno Reactive Hyperemia Occurs Via Activation of Inwardly Rectifying Potassium Channels and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase in Humans / A.R. Crecelius, J.C. Richards, G. J. Luckasen, D. G. Larson, F. A. Dinunno // Circulation Research. – 2013. – Vol. 113. – P. 1023-1032.
29. Ashcoft, F. M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion / M. F. Ashcoft // J. Clin. Invest – 2005. – Vol. 115. – P. 2047-2058.
30. Ashcroft, F. M. Correlating structure and function in ATP-sensitive K^{+} channels / F. M. Ashcroft // Trends Neurosci. – 1998. – Vol. 21, N 7. – P. 288-294.
31. Association and stoichiometry of KATP channel subunits / J. P. Clement [et al.] // Neuron. – 1997. – Vol. 18, N 5. – P. 827-838.

32. ATP-Sensitive K⁺ Channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits / G. C. Kane [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 3. – S169–S175.
33. ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart / M. M. Schnitzler [et al.] // *J. Physiol.* – 2000. – Vol. 525. – Pt. 2. – P. 307–317.
34. Aversano T, Ouyang P, Silverman H. Blockade of the ATP-sensitive potassium channel modulates reactive hyperemia in the canine coronary circulation // *Circ Res.* – 1991. – Vol. 69. – P. 618–622.
35. Aziz, Q. Regulation of the ATP-sensitive potassium channel subunit, Kir6.2, by a Ca²⁺-dependent protein kinase C / Q. Aziz, A.M. Thomas, T. Khambra, A. Tinker // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287, №9. – P. 6196–6207.
36. Banitt, P.F. Activation of ATP-sensitive potassium channels contributes to reactive hyperemia in humans / P.F. Banitt, P. Smits, S.B. Williams, P. Ganz, M.A. Creager // *Am J Physiol.* – 1996. – Vol. 271. – P. H1594–H1598.
37. Bates, E. Ion channels in development and cancer / E. Bates // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 31. – P. 231–247.
38. bFGF activates endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels involving G-proteins and tyrosine kinases / C.R. Kuhlmann [et al.] // *J. Vascular Pharmacology.* – 2005. – Vol. 41. – P. 181–186.
39. BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca²⁺ release in smooth muscle cells of porcine coronary artery / H. Yamamura [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2001. – Vol. 132. – P. 828–834.
40. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions / P.D. Langton [et al.] // *J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260. – P. 927–934.
41. Brzezinska, A.K. Peroxynitrite reversibly inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat cerebral artery smooth muscle cells / A.K. Brzezinska, D. Gebremedhin, W.M. Chilian, B. Kalyanaraman, S.J. Elliott // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – Vol. 278. – P. H1883–H1890.
42. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone / J. Ledoux [et al.] // *Physiology.* – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 69–78.
43. Calderone, V. Large-conductance, Ca-activated K-channels: function, pharmacology and drugs. / V. Calderone // *Curr Med Chem.* – 2002. – Vol. 9. – P. 1385–1395.
44. Catterall, W.A. Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology / W.A. Catterall, // *Neuron.* – 2010. – Vol. 67. – P. 915–928.
45. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel in vivo / M. Russell [et al.] // *FASEB Journal.* – 2002. – Vol. 16. – P. 102–104.
46. Cui, J Molecular mechanism of BK channel activation / J. Cui, H. Yang, U.S. Lee // *Cell Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66, № 5. – P. 852–875.
47. Decreased expression of aortic KIR6.1 and SUR2B in hypertension does not correlate with changes in the functional role of K(ATP) channels / J. Blanco-Rivero, [et al.]. *Eur J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 587. – P. 204–208.
48. Decreased Expression of Voltage- and Ca²⁺ -Activated K⁺ Channels in Coronary Smooth Muscle During Aging / I. Marijic [et al.] // *Circ Res.* – 2001. – Vol. 88. – P. 210–216.
49. Dong, D.L. Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases / D.L. Dong, Y.L. Bai, B.Z. Cai // *Adv Protein Chem Struct Biol.* – 2016. – Vol. 104. – P. 233–261.
50. Doughty, J. M. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium / J. M. Doughty, E. Plane, P. D. Langton // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 1107–1112.
51. Dunn, S.M. Decreased EDHF-mediated relaxation is a major mechanism in endothelial dysfunction in resistance arteries in aged mice on prolonged high-fat sucrose diet / S.M. Dunn, R.H. Hilgers, K.C. Das // *Physiol Rep.* – 2017. – Vol. 5, №23. pii: e13502. doi: 10.14814/phy2.13502.

52. Edwards, G. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: A synopsis / G. Edwards, M. Feletou, A.H. Weston // *Pflugers Arch.* – 2010. – Vol. 459. – P. 863 – 879.
53. Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts / V.V. Fedorov [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 51. – P. 215 - 225.
54. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone / C. J. Garland [et al.] // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1995. – Vol. 16. – P. 23-30.
55. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels / W.A. Chutkow [et al.] // *J Clin Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 203-208.
56. Essential role of nitric oxide in sepsis-induced impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in rat pulmonary artery / Subramani J. [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2010. – Vol. 630, №(1-3). – P. 84-91. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.12.026.
57. Estrogen Relaxes Coronary Arteries by Opening BKCa-Channels Through a cGMP-Dependent Mechanism / E. Richard [et al.] // *Circulation Research.* – 1995. – Vol. – 77. – P. 936–945.
58. Farouque, H. M. Effect of ATP-Sensitive Potassium Channel Inhibition on Resting Coronary Vascular Responses in Humans / H.M.O. Farouque, S.G. Worthley, I.T. Meredith, R. P. Andrew // *Circulation Research.* – 2002. – Vol. 90. – P. 231-236
59. Feletou, M. EDHF: new therapeutic targets? / M. Feletou, P. M. Vanhoutte // *Pharmacol Res.* – 2004. – Vol. 49. – P. 595-580.
60. Foster, M.N. KATP Channels in the Cardiovascular System / M.N. Foster and W.A. Coetzee // *Physiol Rev.* – 2016. – Vol. 96, №1. – P. 177-252.
61. Garlid, A.O. Mitochondrial reactive oxygen species: which ROS signals cardioprotection? / A.O. Garlid, M. Jaburek, J.P. Jacobs., K.D. Garlid // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2013. – Vol. 305, №7. – P. H960- H968. doi: 10.1152/ajpheart.00858.2012.
62. Gerald M. Herrera and Mark T. Nelson Differential regulation of SK and BK channels by Ca²⁺ signals from Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes // *Journal of Physiology.* – 2002. – Vol. 541, №2. – P. 483-492.
63. Gluais, P. Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery / P. Gluais, , G. Edwards, A.H. Weston, J.R. Falck, P.M. Vanhoutte, M. Féletou // *Br J Pharmacol.* – 2005. – Vol. – 144, №4. – P. 477-85.
64. Goto, K. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels / K. Goto, T. Ohtsubo, T. Kitazono // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, №1. pii: E315. doi: 10.3390/ijms19010315.
65. Goto, K. Upregulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor compensates for the loss of nitric oxide in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive hypertensive rats / K. Goto, Kansui Y., Oniki H., Ohtsubo T., Matsumura K., Kitazono T. // *Hypertens Res.* – 2012. – Vol. 35, №8. – P. 849-54. doi: 10.1038/hr.2012.36.
66. H₂O₂ opens mitochondrial KATP channels and inhibits GABA receptors via protein kinase C- ϵ in cardiomyocytes / H. Zhang [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2002. – Vol. 282. – P. H1395-H1403.
67. Hermann, A. Oxidative Stress and Maxi Calcium-Activated Potassium (BK) Channels / A. Hermann, G. F. Sitdikova, Th.M. Weiger // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1870-1911.
68. Hermann, A. Weiger Oxidative Stress and Maxi Calcium-Activated Potassium (BK) Channels / A. Hermann, G. F. Sitdikova, M. Thomas // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1870-1911
69. Hyperhomocysteinemia potentiates diabetes-impaired EDHF-induced vascular relaxation: Role of insufficient hydrogen sulfide / Z. Cheng [et al.] // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. – 16. – P. 215-225. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.006.

70. Impaired Action of Levromakalim on ATP-Sensitive K⁺ Channels in Mesenteric Artery Cells From Spontaneously Hypertensive Rats / O. Yusuke [et al.] // *Hypertension*. – 1996. – Vol. 27. – P.1234-1239.
71. Impaired arachidonic acid-mediated activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary arterial smooth muscle cells in Zucker Diabetic Fatty rats / T. Lu [et al.] // *Diabetes*. 2005. – Vol. 54. – P. 2155–2163.
72. Impaired function of coronary BKCa-channels in metabolic syndrome / L. Borbouse [et al.] // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297. – P. 1629–1637.
73. International Union of Pharmacology. Ion Channel Compendium: potassium channels. International Union of Pharmacology [Electronic resource]. – 2002. – Mode of access: www.iuphar.org.
74. Ion channelopathies in endocrinology: Recent genetic findings and pathophysiological insights / A.L.R. Rolim [et al.] // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* – 2010. – Vol. 54. – P. 673–681.
75. Jackson, W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth / W.F. Jackson // *Adv Pharmacol.* – 2017. – Vol. 78. – P. 89-144. doi: 10.1016/bs.apha.2016.07.001.
76. Jaggar J.H. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol. Scand.* 164: 577–587. 1998.
77. Jaggar J.H., Stevenson A.S., Nelson M.T. Voltage dependence of Ca²⁺ sparks in intact cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 274: 1755–1761. 1998.
78. Kavazis, A.N. Exercise preconditioning of the myocardium / A.N. Kavazis // *Sports Med.* – 2009. – Vol. 39, №11. – P. 923-935. doi: 10.2165/11317870-000000000-00000.
79. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury / E. Soltysinska [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e103402, doi:10.1371/journal.pone.0103402.
80. Keli, H. ATP-Sensitive Potassium Channel Traffic Regulation by Adenosine and Protein Kinase C / Keli H. et al. // *Neuron*. – 2003. – Vol. 38. – P. 417-432.
81. Ketamine blocks Ca²⁺-activated K⁺ channels in rabbit cerebral arterial smooth muscle cells / J. Han [et al.] // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 1347-1355.
82. Kominková, V. Effect of ethanol on tracheal potassium channels reconstituted into bilayer lipid membranes / V. Kominková, M. Magova, A. Mojzisoá, E. Maleková, K. Ondrias // *Physiol Res.* – 2001. – Vol. 50, №5. – P. 507-511.
83. Kullmann, D.M.; Waxman, S.G. Neurological channelopathies: New insights into disease mechanisms and ion channel function: Neurological channelopathies. / D.M. Kullmann, S.G. Waxman // *J. Physiol.* – 2010, Vol. 588. – 1823–1827
84. Kunzelman, K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease / K. Kunzelman, M. Mall // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 245-289.
85. Lazuko, S.S. Functional Activity of BKCa Channels in Coronary Vascular Smooth Muscle Cells during Combined Exposure to Hyperglycemia and Stress / S.S. Lazuko, A.P. Solodkov, S.S. Skrinaus // *Bull Exp Biol Med.* – 2014. – Vol. 156, №3. – P. 310-6.
86. Lee, U.S. BK channel activation: Structural and functional insights / U.S. Lee, J.Cui. // *Trends Neurosci.* – 2010. – Vol. 33. – P. 415–423
87. Leo, M.D. Angiotensin II stimulates internalization and degradation of arterial myocyte plasma membrane BK channels to induce vasoconstriction / M.D. Leo, S. Bulley, J.P. Bannister, K.P. Kuruvilla, D. Narayanan, J.H. Jaggar // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2015. – Vol. 309, №6. – P. C392-402.
88. Li XP, Zhao QQ, Yang L, Li HQ, Cui XL. Effects 'of β_3 adrenoceptors on the contractility of rat thoracic aorta smooth muscle and the mechanism / *Chinese journal of applied physiology*. 2016. 32(1):69-73

89. Lu, T. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by high glucose / T. Lu, T. He, Z.S. Katusic, H.-C. Lee // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99. – P. 607-616.
90. Lu, T. Regulation of coronary arterial BK channels by caveolae-mediated angiotensin II signaling in diabetes mellitus / T. Lu,; D.-M. Zhang, X.-L. Wang,; T. He, R.-X. Wang, Q. Chai, Z.S. Katusic, H.-C. Lee // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 106. – P. 1164–1173.
91. Lui, C. H. Stoking Up BKCa Channels in Hemorrhagic Shock / Lui H. Clapp, N. O. Nelson // *Circulation Research.* – 2007.– Vol. 101. – P. 436–438.
92. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle / M. Kathleen [et al.] // *Biochemistry.* – 1992. – Vol. 31, № 29. – P. 6719–6727.
93. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier / Takashi Miki [et al.] // *Nature medicine.* – 2002. – Vol. 8, N 7. – P. 446-472.
94. Myocardial impairment in chronic hypoxia is abolished by short aeration episodes: involvement of K^{+} ATP channels / G. Milano [et al.] // *Experimental Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 229. – P. 1196-1205.
95. N’Gouemo, P. Targeting BK (big potassium) channels in epilepsy / N’Gouemo, P. // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2011. – Vol. 15. – P. 1283-1295.
96. Nagar, D. Estrogen regulates β_1 -subunit expression in Ca^{2+} -activated K^{+} channels in arteries from reproductive tissues / D. Nagar, X.-T. Liu, C. R. Rosenfeld // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 4. – P. 1417–1427.
97. Nardi, A. BK channel modulators: A comprehensive overview / Nardi, A.; Olesen, S.-P. // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15. – 1126-1146.
98. Nelson, M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M.T. Nelson, J.M. Quayle // *J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 799-822.
99. Nilius, B., Viana, F., Droogmans, G. Ion channels in vascular endothelium // *Annu. Rev. Physiol.* - 1997a. – Vol.59. – P.145–170.
100. Noma A. ATP-regulated K^{+} channels in cardiac muscle // *Nature.* – 1983. –Vol. 305. – P.147-148.
101. Opening of Ca^{2+} -activated K^{+} channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts / Y. Shintani [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2004. – Vol. 37. – P. 1213–1218.
102. Opening of Ca^{2+} -activated K^{+} channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice / X. Wang [et al.] // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 2070–2077
103. Oyama, J. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and hypertension / J. Oyama, K. Node // *Hypertens Res.* – 2013. – Vol. 36, №10. – P. 852-853. doi: 10.1038/hr.2013.97.
104. Paterno, R. Role of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels in cerebral vasodilatation induced by increases in cyclic GMP and cyclic AMP in the rat / R. Paterno, F.M. Faraci, D.D. Heistad // *Stroke.* – 1996. – Vol. 27. – P. 1603–1607.
105. Physiological roles of K^{+} channels in vascular smooth muscle cells / E. A. Ko [et al.] // *J. Smooth Muscle Res.* – 2008. – Vol. 44. № 2. – P. 65–81.
106. Pintérová, M. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension / M. Pintérová, J. Kuneš, J. Zicha // *Physiol Res.* 2011. – Vol. 60, №3. – P. 381-402.
107. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney / C. M. Troncoso Brindeiro [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – Vol. 21. – P. 165–181.
108. Randall, M.D. The involvement of ATP-sensitive potassium channels in β -adrenoceptor-mediated vasorelaxation in the isolated rat mesenteric arterial bed / M.D. Randall, A.I. McCulloch // *Br.J. Pharmacol.* – 1995. - Vol.115. – P.607-612.
109. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy / S. Nawate [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2005. – Vol. 144, №2. – P. 178-89.

110. Reduced vascular smooth muscle BK channel current underlies heart failure-induced vasoconstriction in mice / E. Wan [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2013. – Vol. 27, №5. – P. 1859-1867.
111. Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo / H. C. Parkington [et al.] // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 542. – P. 929–937.
112. Sadlonova, V. Participation of BKCa²⁺ and KATP potassium ion channels in the contractility of human term pregnant myometrium in in vitro conditions / V. Sadlonova, S. Franova, K. Dokus, F. Janicek, J. Visnovsky, J. Sadlonova // *J Obstet Gynaecol Res.* – 2011. – Vol. 37, №3. – P. 215-21.
113. Shyng, S. Control of rectification and gating of cloned KATP channels by the Kir6.2 subunit / S. Shyng, T. Ferrigni, C. G. Nichols // *J. Gen. Physiol.* – 1997. – Vol. 110, N 2. – 141-153.
114. Similarities in the pharmacological modulation of reactive hyperemia and vasodilation to hydrogen peroxide in rat skeletal muscle arterioles: effect of probes for endothelium-derived mediators / M. S. Wolin [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1990. – Vol. 253. – P. 508-512.
115. Singh, H. MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location / H. Singh, R. Lu, J.C. Bopassa, A.L. Meredith, E. Stefani, L. Toro // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2013. – Vol. 110. – P. 10836 – 10841.
116. Singh, L. Mechanisms involved in adenosine pharmacological preconditioning-induced cardioprotection / L. Singh, R. Kulshrestha, N. Singh, A.S. Jaggi // *Korean J Physiol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 22, №3. – P. 225-234. doi: 10.4196/kjpp.2018.22.3.225.
117. Small- and intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells / J.-Z. Sheng [et al.] // *J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. 458-467.
118. Smith, C.O. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection / C.O. Smith, K. Nehrke, P.S. Brookes // *Biochem J.* – 2017. – Vol. 474, №12. – P. 2067-2094. doi: 10.1042/BCJ20160623.
119. Stoichiometry of sulfonylurea action / E. Brecardm [et al.] // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42, № 232. – Suppl. 1. – P. A65.
120. Suzuki, M. Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice / Suzuki M., et al. // *J. Clin. Invest.* – 2002. – P. 509-516.
121. Tajada, S. High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K⁺ channels in mice mesenteric vascular smooth muscle cells / S. Tajada, P. Ciudad, A. Moreno-Dominguez, M.T. Perez-Garcia, R. Lopez-Lopez // *J Physiol.* – 2012. – Vol. 590. – P. 6075–6091.
122. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel / Viju P. Deenadayalu [et al.] // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. 1720–1727.
123. The BK channel β 1 subunit gene is associated with human baroreflex and blood pressure regulation / M. Gollasch [et al.] // *J. Hypertens.* – 2002. – Vol. 20. – P. 927– 933.
124. Thorneloe, K.S. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility / K.S. Thorneloe, M.T. Nelson // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 83, №3. – P. 215-242.
125. Tinker, A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system / A. Tinker, Q. Aziz, A. Thomas // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 171. – P. 12–23
126. Transgenic expression of a dominant negative KATP-channel subunit in the mouse endothelium: effects on coronary flow and endothelin-1 secretion / B. Malester [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – N 6. – P. 956-961.
127. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1 / L. R. Conti [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 44. – P. 1270-1278

128. Trowbridge, I. S. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway / Trowbridge I. S., Collawn J. F., Hopkins C. R. // *Annu. Rev. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 9. – P. 129-161.
129. Vale, S. Psychosocial stress and cardiovascular diseases / S. Vale // *Postgrad. Med. J.* – 2005. – Vol. 81. – P. 429-435.
130. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption / G. M. Rubanyi [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99, № 10. – P. 2429–2437
131. Walters, F.S. Potent inhibition of the aortic smooth muscle maxi-K channel by clinical doses of ethanol / F.S. Walters, M. Covarrubias, I.S. Ellingson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 279, № 4. – P. 1107–1115.
132. Wilde, A. A. Role of ATP-sensitive K⁺ channel current in ischemic arrhythmias / Wilde A. A. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 1993. – Vol. 7. – Suppl. 3. – P. 521-526.
133. Xu, Y. Acetylcholine stimulated dilatation and stretch induced myogenic constriction in mesenteric artery of rats with chronic heart failure / Xu Y., R.H. Henning, E. Lipsic, A. van Buiten, W.H. van Gilst, H. Buikema // *Eur J Heart Fail.* – 2007. – Vol. 9, №2. – 144-151. Epub 2006 Jul 7.
134. Yang, Q. Calcium-activated potassium channels in vasculature in response to ischemia-reperfusion / Q. Yang, M.J. Underwood, G.W. He // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2012. Vol. 59. – P. 109 – 115.
135. Yang, Y. Oxidative stress inhibits vascular K(ATP) channels by S-glutathionylation / Y. Yang, W. Shi, N. Cui, Z. Wu, C. Jiang // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, №49. – P. 38641-38648.
136. Ye, P. Functional protection against cardiac diseases depends on ATP-sensitive potassium channels // Ye P., Zhu Y.R., Gu Y., Zhang D.M., Chen S.L. // *J Cell Mol Med.* – 2018. – Vol. 22, №12. – P. 5801-5806.

ГЛАВА 4

iNOS-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА СОСУДОВ СЕРДЦА

Современные исследования показали, что в сердце экспрессируются все три изоформы NO-синтазы (NOS) — эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [18]. С конститутивными изоформами NO-синтаз (eNOS, nNOS) связывают такие его протективные свойства, как вазодилатация, угнетение процессов агрегации, открытие K_{ATP} -каналов, регуляция коронарной циркуляции и сердечных сокращений [22].

Роль монооксида азота, продуцируемого iNOS, в кардиопротекции до настоящего времени остается противоречивой. Вероятно, влияние активации iNOS на функциональное состояние миокарда во многом зависит от количества NO, длительности его образования, а также от локализации и условий, в которых он будет синтезирован.

Традиционно считается, что iNOS синтезируется при патологических состояниях. В этом случае NO продуцируется в количествах, тысячекратно превышающих его нормальную продукцию. В то же время, нет единого мнения о влиянии больших количеств NO, продуцируемого iNOS, на функцию кардиоваскулярной системы. С одной стороны, показано, что при тяжелой периодической гипоксии, характерной для апноэ во сне, наблюдается высокая активность и экспрессия iNOS, что сопровождается выраженным ростом уровня NO в миокарде, и повышением риска развития гипертензии, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда [36]. С другой стороны, описаны кардио- и вазопротективные эффекты NO, наблюдаемые при активации iNOS. В частности, умеренная периодическая гипоксия сопровождается антиаритмическим эффектом [19], снижает артериальное давление при гипертензии [7, 24], используется при реабилитации пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование [1, 23], и предупреждает дисфункцию эндотелия у животных с экспериментальной гипертензией [1, 8, 33].

Хорошо известно, что ишемия/реперфузия (ИР) сердца вызывает повреждение не только миокарда, но и коронарных сосудов, которое проявляется в длительной и выраженной дисфункции коронарного эндотелия, связанной со структурными и функциональными изменениями эндотелиальных клеток [26], нарушением активности эндотелиальной NO-синтазы [52] и снижением биодоступности NO в результате его усиленного разрушения активными формами кислорода [48]. Положительные эффекты NO наиболее полно описаны при «классическом ишемическом прекондиционировании миокарда». Термин «прекондиционирование» следует понимать как «адаптацию органа к прерывистой ишемии» [10]. В ишемической адаптации выделяют две фазы: ранняя (или классическая), которая развивается непосредственно после прекондиционирования и длится несколько часов и поздняя (или второе защитное окно), которая появляется через 24–72 ч и длится несколько суток. Каждая из фаз имеет свои механизмы развития [40, 50]. Именно во втором окне прекондиционирования NO, образуемый iNOS, имеет важное значение в проявлении адаптационных эффектов [15, 27, 54].

Нами впервые продемонстрировано, что монооксид азота, продуцируемый iNOS, наряду с NO, синтезируемым eNOS (эндотелиальная NO-синтаза), имеет важное значение в регуляции тонуса коронарных сосудов при адаптации короткими стрессорными воздействиями. А также и то, что монооксид азота, продуцируемый iNOS, играет важную роль в формировании процессов адаптации.

4.1. Роль индуцибельной NO-синтазы в регуляции тонуса сосудов сердца при экспериментальном сахарном диабете, иммобилизационном стрессе и адаптации к коротким стрессорным воздействиям

При неадекватном повышении тонуса сосудов первой реакцией является повышение синтеза NO, что наблюдается на ранних стадиях артериальной гипертензии, атеросклероза, сахарного диабета, хронической сердечной недостаточности [20, 57].

Повышение концентрации монооксида азота может быть рассмотрено как один из патогенетических механизмов шока различного генеза [5]. Известно, что при септическом шоке снижение артериального давления вызвано гиперпродукцией NO, продуцируемого iNOS [44]. Схожая картина наблюдается и при геморрагическом шоке [56].

Концентрация монооксида азота в сыворотке крови увеличивается не только при шоке, но и при иных заболеваниях, таких как кардиомиопатия [31], миокардит, инфаркт миокарда [36, 39]. Стойкое повышение монооксида азота при этих состояниях сопровождается гипотонией сосудов и снижением сократительной функции миокарда. Гиперпродукция монооксида азота может обуславливаться экспрессией iNOS под влиянием цитокинов опосредована активирующимся ядерным фактором транскрипции NFkB и, в некоторых случаях, активацией cNOS [55].

При избытке NO происходит инактивация железосодержащих белков - дыхательных ферментов митохондрий, что ингибирует рост и деление клеток. Также NO, соединяясь со свободными радикалами кислорода, образует пероксинитрит, вызывающий повреждение ДНК [43].

Избыток NO в сердечно-сосудистой системе повышает проницаемость сосудов, следствием чего является развитие отеков тканей, вызывает кардиотоксическое действие, провоцирует стойкую генерализованную вазодилатацию и выраженное падение АД [3, 29].

Повышение продукции монооксида азота, имеющее большое адаптивное значение, способно превратиться из адаптивного механизма в патологический.

Впервые будет проведено сравнение роли NO в регуляции функций сосудов и сердца, при адаптации к коротким стрессорным воздействиям, с таковыми при патологических состояниях, сопровождающиеся гиперпродукцией NO – иммобилизационном стрессе и экспериментальном сахарном диабете. Эксперименты были выполнены на изолированном по Лангендорфу сердцах и изолированном кольце аорты.

Исследования проводились на белых нелинейных крысах-самках массой 180-220 г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на исследуемые показатели эксперименты проводились в весенне-летний период в первой половине дня. Все животные находились в одинаковых условиях.

Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Council for International Organizations of Medical Sciences CIOMS и International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Протокол проведения экспериментов был утвержден Комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными УО «ВГМУ».

Сахарный диабет у крыс моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг), разведенного в цитратном буфере (pH 4,5). Контрольным крысам однократно внутрибрюшинно вводили равное количество цитратного буфера без стрептозоцина. Поскольку далее не было обнаружено достоверного изменения изучаемых показателей контрольных животных с интактными, которым не вводили цитратный буфер, все сравнения проводили с группой «контроль». Через 14 дней после введения стрептозоцина крыс с уровнем глюкозы в крови выше 20 ммоль/л и

глюкозурией брали в эксперимент. Концентрацию глюкозы в крови хвостовой вены определяли при помощи глюкометра Finetest (Корея), мочи – Глюко-Альбу-рН-Уротестом УП «Унитехпром БГУ».

Стресс вызывали путем фиксации животных в положении на спине без ограничения подвижности головы в течение 6 часов. По окончании иммобилизации крыс выпускали на 90 минут в клетку, затем брали в эксперимент.

Адаптацию проводили в течение 8 суток по следующей схеме: крысу помещали в пластиковый пенал и погружали в воду с температурой (22°C) до уровня шеи: 1-й день - 5 мин., 2-й день - 10 мин., 3-й день - 15 мин. После 2-х дневного перерыва адаптацию повторяли. Через сутки животных брали в эксперимент.

Кольца аорты шириной по 3мм иссекали из средней трети грудной аорты и помещали в термостатируемые ванночки, наполненные раствором Кребса-Хензелята следующего состава (мм/л): NaCl – 118; KCl – 4,8; MgSO_4 1,18; KH_2PO_4 -1,2; CaCl_2 – 2,5; NaHCO_3 – 25,0; глюкоза - 11; pH – 7,4; насыщенным карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2) при температуре 37°C . В течение периода стабилизации, который составлял 2 часа, каждые 15 минут обновляли, омывающий препарат аорты, раствор Кребса-Хензелята. Эксперимент проводили на приборе Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Кольцо аорты сокращалось в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ, рис. 4.1).



Рисунок 4.1. Установка для перфузии изолированного кольца аорты (прибор Schuler Organ bath Type 809)

Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций $\alpha 1$ -адреностимулятора фенилэфрина (от 10^{-15} до 10^{-6}M). На высоте предсокращения препарата и после его стабилизации в ванночку добавляли ацетилхолин в дозозависимой манере от 1×10^{-10} до $3 \times 10^{-5}\text{M}$. Таким образом, вазоконстрикцию и вазодилатацию изучали на одном и том же сегменте аорты. Для выяснения роли iNOS использовали ее высокоселективный блокатор S-метилизотиомочевину (S-MT) (10 мкМ, Sigma, США). О чувствительности сосудов сердца судили по величине EC_{50} , представляющей собой концентрацию исследуемого вещества, вызывающую 50% ответную реакцию аортальных колец.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel», а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA).

Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%;75%]. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p < 0,05$).

4.1.1. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс, перенесших иммобилизационный стресс

Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-6} М) введение α_1 - адреностимулятора фенилэфрина приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы. В контрольной группе животных прирост напряжения изолированного кольца начинался при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 15% от исходного напряжения), а при концентрации 10^{-6} М ответная реакция достигала максимального значения 94%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность адренергической констрикции кольца аорты (рис. 4.2).

В группе животных, перенесших 6-ти часовой стресс, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 14% от исходного напряжения), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 79% от исходного напряжения). Следовательно, в группе животных «стресс» реакция на фенилэфрин была менее выражена по сравнению с контролем. После перенесенного стресса чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину оказалась более выраженной, по сравнению с контролем (в группе контрольных животных EC_{50} составляла $3,66 \times 10^{-11}$ М, в группе «стресс» $EC_{50} = 8,16 \times 10^{-12}$ М, табл. 4.1.).

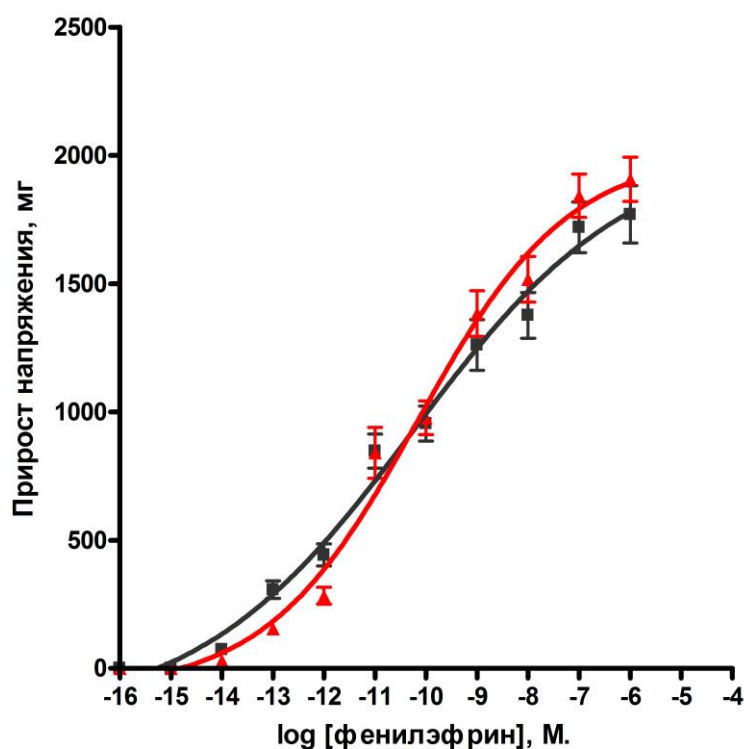


Рисунок 4.2. Влияние S-метилизотиомочевина на изменение сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, контрольной группы животных.

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – сокращение в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина. * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM).

■ – группа «Контроль»; ▲ – «Контроль+ S-метилизотиомочевина»

Таблица 4.1. Влияние иммобилизационного стресса на изменение чувствительности аортальных сосудов к фенилэфрину

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
Контроль (n=7)	$3,66 \times 10^{-11}$	$2,34 - 5,70 \times 10^{-11}$
Иммобилизационный стресс (n=7)	$8,16 \times 10^{-12}^*$	$5,14 \times 10^{-12} - 1,29 \times 10^{-11}$

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

Добавление в перфузионный раствор ингибитора iNOS S-MT в группе животных перенесших стресс, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост составил 37% от исходного напряжения), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 103% от исходного напряжения). Таким образом, инкубация сегмента аорты с S-MT полностью устраняла влияние стресса на сократительную реакцию, вызываемую фенилэфрином (рис. 4.3), чувствительность кольца аорты к фенилэфрину при этом не изменялась и оставалась такой же, как и при стрессе до блокады индуцированной NO-синтазы, EC₅₀ составляла $4,86 \times 10^{-12}$ М (табл. 4.2.).

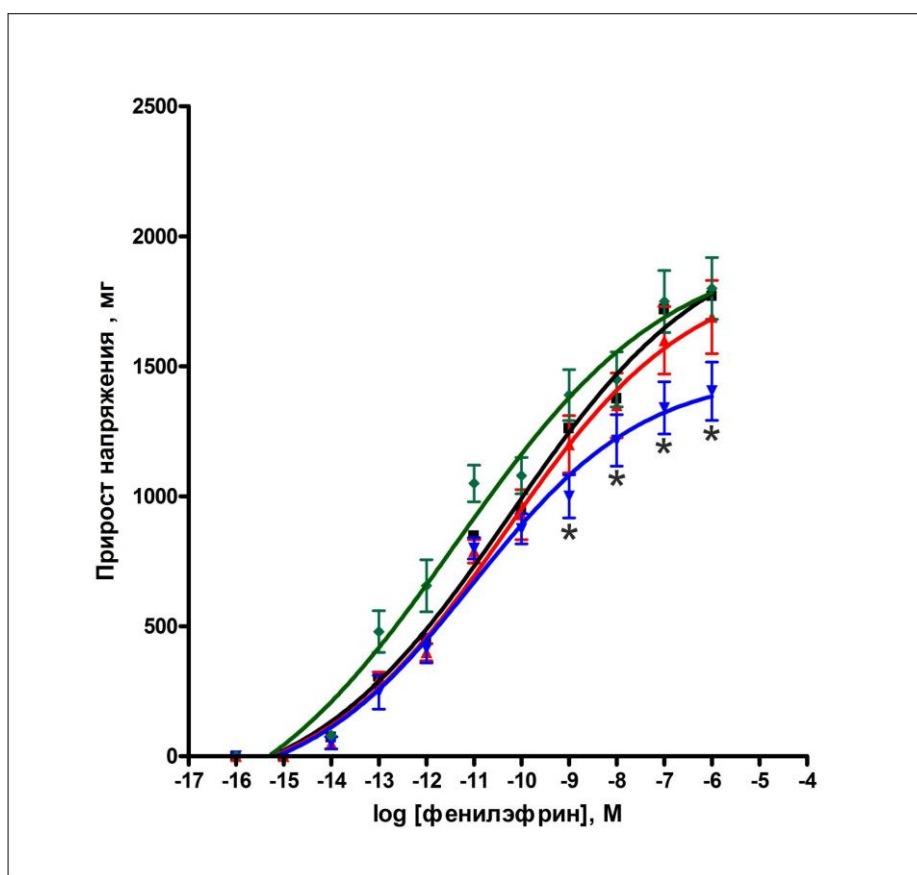


Рисунок 4.3. Влияние возрастающих концентраций фенилэфрина на величину сократительного ответа изолированного кольца аорты крыс, перенесших стресс на фоне введения в перфузионный раствор S-метилизотиомочевины.

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – сокращение в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина. * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM).

■ – группа «Контроль»; ▼ – «Стресс»; ♦ – «Стресс+S-метилизотиомочевина»

Таблица 4.2. Влияние S-метилизотиомочевина на изменение чувствительности аортальных сосудов к фенилэфрину в группе животных перенесших иммобилизационный стресс

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
Контроль+S-MT (n=7)	$6,75 \times 10^{-11}$	$4,46 \times 10^{-11} - 1,02 \times 10^{-10}$
Иммобилизационный стресс+S-MT (n=7)	$4,86 \times 10^{-12*}$	$3,35 - 7,04 \times 10^{-12}$

Примечание - *- p<0,05 по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

4.1.2. Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс, перенесших иммобилизационный стресс

В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации 3×10^{-8} М и составляла 12%. При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе 3×10^{-5} М и достигала 60%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность эндотелий-зависимой дилатации кольца аорты и чувствительности гладкомышечных клеток аорты к ацетилхолину (табл. 4.3., 4.4.).

Таблица 4.3. Влияние иммобилизационного стресса на изменение чувствительности аортальных сосудов к ацетилхолину

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
Контроль (n=7)	$1,57 \times 10^{-7}$	$1,57 - 1,71 \times 10^{-7}$
Иммобилизационный стресс (n=7)	$1,70 \times 10^{-7}$	$1,57 - 1,84 \times 10^{-7}$

Примечание - *- p<0,05 по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

Таблица 4.4. Влияние S-метилизотиомочевина на изменение чувствительности аортальных сосудов к ацетилхолину в группе животных перенесших иммобилизационный стресс

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
Контроль+S-MT (n=7)	$1,51 \times 10^{-7}$	$1,45 - 1,58 \times 10^{-7}$
Иммобилизационный стресс+S-MT (n=7)	$1,57 \times 10^{-7}$	$1,46 - 1,68 \times 10^{-7}$

Примечание - *- p<0,05 по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

После перенесенного стресса, дилатация изолированного кольца аорты, так же как и в контроле начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке 3×10^{-8} М и составляла 17%. Максимальная дилатация достигала 79% при концентрации ацетилхолина 3×10^{-5} М (на 19% больше, чем в контроле, p<0,05). При этом, чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину между группами не различались (EC₅₀ составила при стрессе – $1,70 \times 10^{-7}$ М, в контроле – $1,57 \times 10^{-7}$ М, табл. 4.3). Инкубирование сегмента аорты с S-MT устраняло постстрессорное изменение эндотелий-зависимой вазодилатации. Дилатация изолированного кольца аорты становилась такой же, как в контроле. Она начиналась при концентрации ацетилхолина 3×10^{-8} М, а ее максимум

достигался при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ и составлял 58% (в контроле 60%, рис. 4.4). Чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов составила $1,53 \times 10^{-7} \text{ M}$ (табл. 4.4).

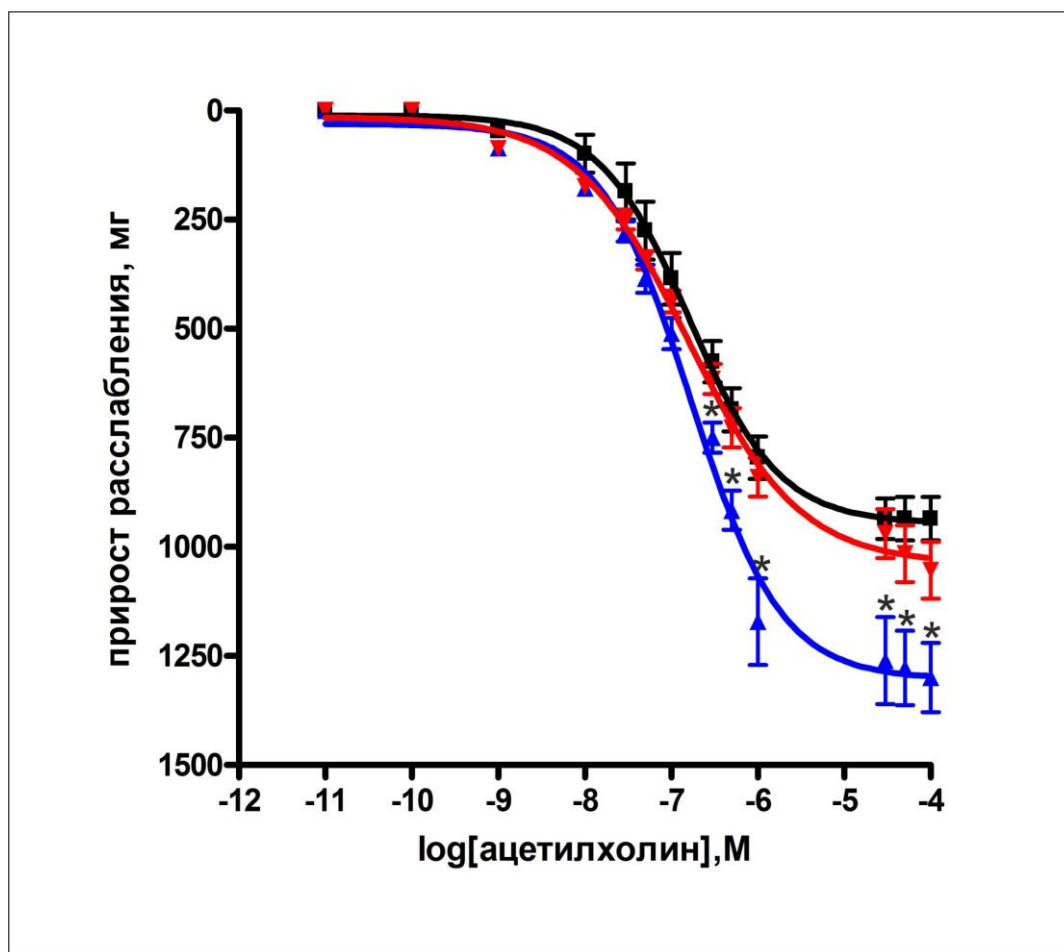


Рисунок 4.4. Влияние S-метилизотиомочевина на стресс-индуцированные изменения эндотелийзависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс, перенесших иммобилизационный стресс.

Примечание: по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат - прирост дилатации изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении ацетилхолина. * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM).

■ – группа «Контроль»; ▲ – «Стресс»; ▼ – «Стресс+S-метилизотиомочевина»

4.1.3. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом

В группе животных, с экспериментальным сахарным диабетом, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина в перфузионном растворе 10^{-12} M (прирост составлял 12% от исходного напряжения). Максимальный прирост напряжения сосудистой стенки составлял 77% от исходного напряжения, при концентрации фенилэфрина в перфузионном растворе 10^{-6} M (рис. 4.5). Следовательно, в группе животных «сахарный диабет» реакция на фенилэфрин была менее выражена по сравнению с контрольными показателями. При экспериментальном сахарном диабете чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину оказалась сниженной по сравнению с контрольными показателями (табл. 4.5).

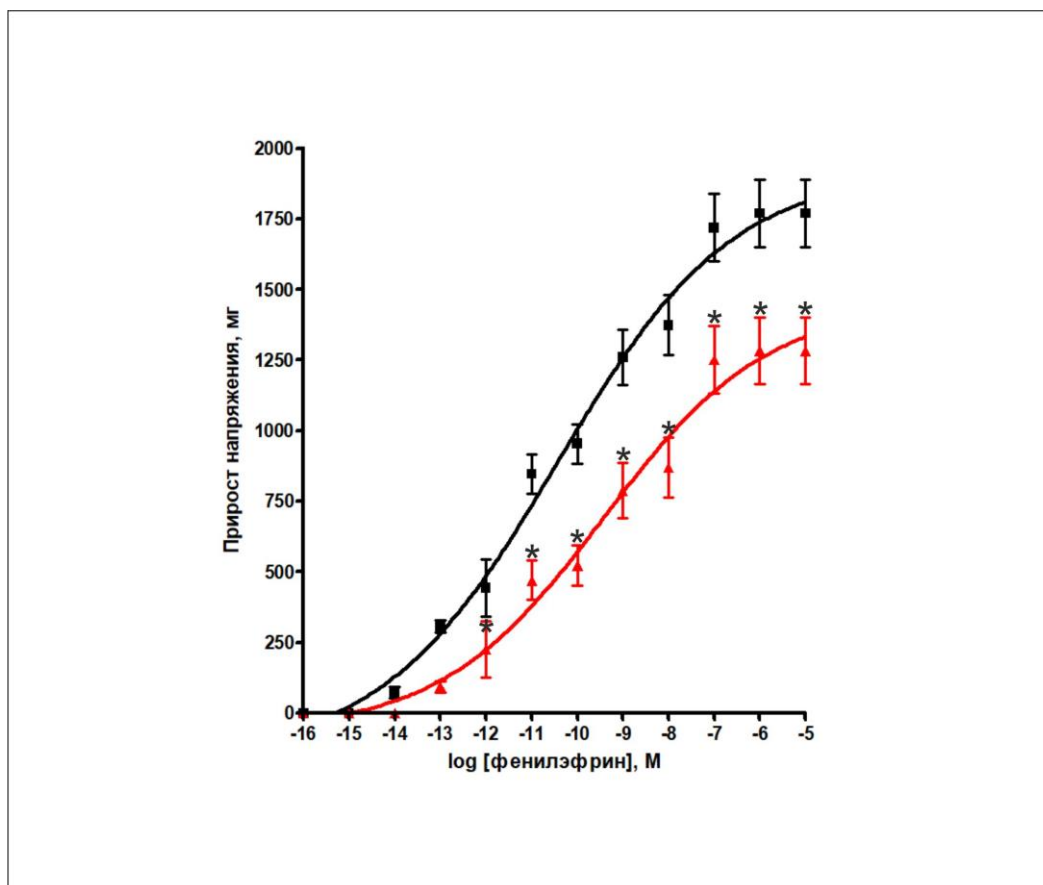


Рисунок 4.5. Изменение адренореактивности изолированных колец аорты крыс, вызванной фенилэфрином, при экспериментальном сахарном диабете

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (M); по оси ординат – сокращение в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина. * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM). ■ – группа «Контроль»; ▲ – «Сахарный диабет»

Таблица 4.5. Влияние экспериментального сахарного диабета на изменение чувствительности аортальных сосудов к фенилэфрину

Группа животных	EC ₅₀ , M	CI 95% EC ₅₀ , M
Контроль (n=7)	$3,66 \times 10^{-11}$	$2,34 - 5,70 \times 10^{-11}$
Сахарный диабет (n=7)	$2,10 \times 10^{-10}$ *	$2,10 - 7,17 \times 10^{-10}$

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

Добавление в перфузионный раствор ингибитора iNOS S-MT в группе животных «сахарный диабет» сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина в перфузионном растворе 10^{-12} M (прирост составлял 16% от исходного напряжения, что было выражено в той же степени, что и до блокады iNOS), и достигал максимума при 10^{-6} M (прирост составлял 93% от исходного напряжения и не отличался от контрольных показателей, рис. 4.6.). Чувствительность изолированных колец аорты к α_1 -адреностимулятору фенилэфрину была выражена в той же степени, что и до блокады iNOS (табл. 4.6.). Этот факт свидетельствует о том, что инкубация сегмента аорты с S-MT частично устраняла влияние сахарного диабета на адренергическую констрикцию изолированного кольца аорты.

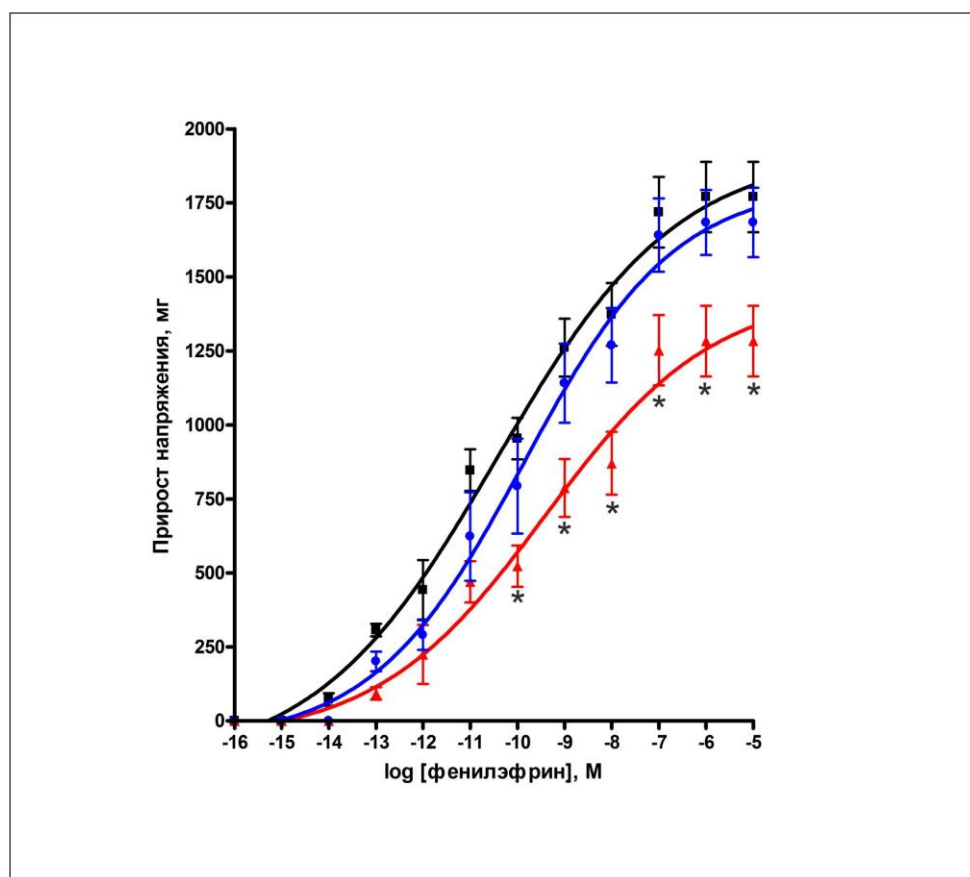


Рисунок 4.6. Влияние S-метилизотиомочевины на изменение адренореактивности колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Примечание - по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат - прирост сокращения изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном введении в перфузионный раствор фенилэфрина.

При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM). *- $p < 0,05$, по сравнению с группой контроль ■ – группа «контроль»; ● – группа «Сахарный диабет»; ▲ – группа «Сахарный диабет+S-MT».

Таблица 4.6. Влияние S-метилизотиомочевины на изменение чувствительности аортальных сосудов к фенилэфрину в группе животных на фоне экспериментального сахарного диабета

Группа животных	EC ₅₀ , M	CI 95% EC ₅₀ , M
Контроль+S-MT (n=7)	$6,75 \times 10^{-11}$	$4,46 \times 10^{-11} - 1,02 \times 10^{-10}$
Сахарный диабет+S-MT (n=7)	$3,88 \times 10^{-10}$ *	$2,10 - 7,17 \times 10^{-10}$

Примечание - *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

4.1.4 Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации 3×10^{-8} M и составляла 12%. При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе 3×10^{-5} M и достигала 60%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность эндотелийзависимой дилатации кольца аорты.

В группе животных «сахарный диабет», дилатация изолированного кольца аорты, так же, как и в контроле начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке $3 \times 10^{-8} \text{M}$ и составляла 19%. Максимальная дилатация достигала 81% при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($p < 0,05$, это на 21% больше, чем в контроле, рис. 4.7).

При этом чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину между группами не различалась (табл. 4.7).

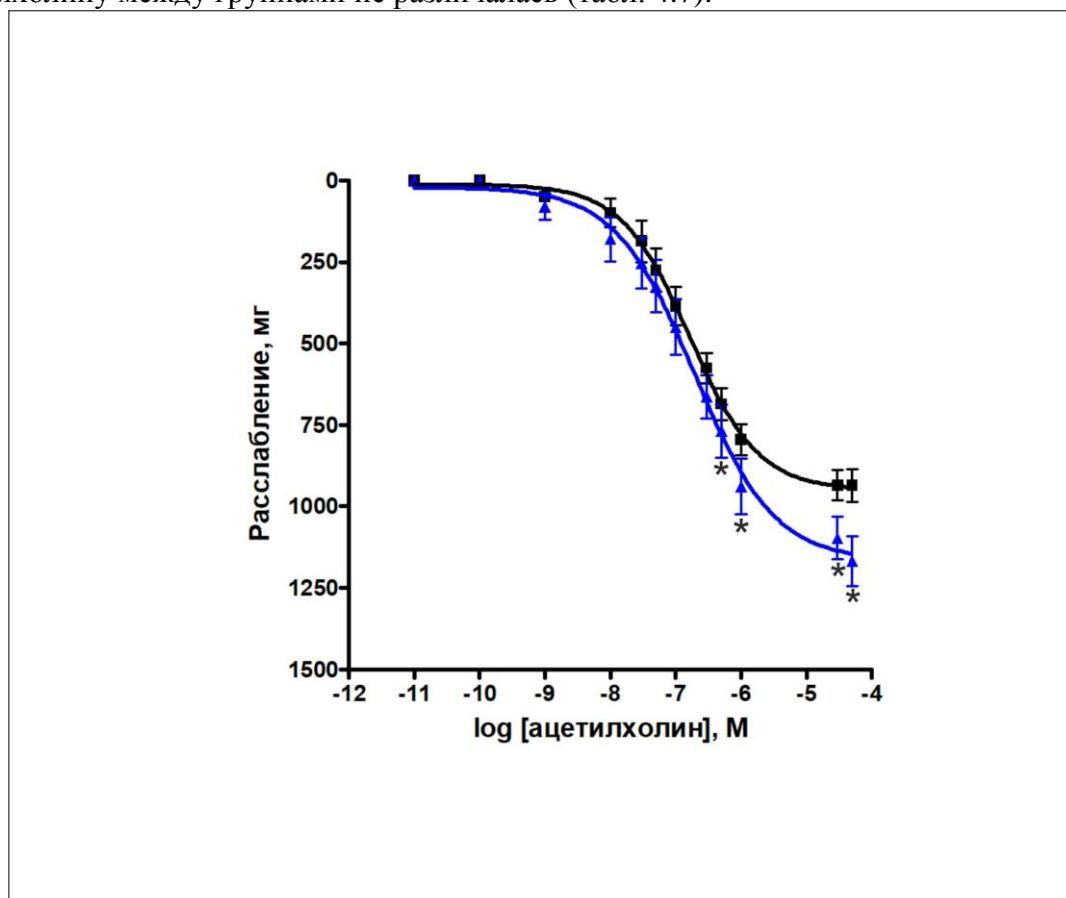


Рисунок 4.7. Эндотелийзависимая вазодилатация колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Примечание - по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – расслабление изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации ацетилхолина.

При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM). *- $p < 0,05$, по сравнению с контролем

■ – группа «Контроль»; ▲ – группа «Сахарный диабет».

Таблица 4.7. Влияние экспериментального сахарного диабета на изменение чувствительности аортальных сосудов к ацетилхолину

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
Контроль (n=7)	$1,57 \times 10^{-7}$	$1,57 - 1,71 \times 10^{-7}$
Сахарный диабет (n=7)	$1,94 \times 10^{-7}$	$1,77 - 2,13 \times 10^{-7}$

Примечание - *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

Инкубирование сегмента аорты с S-MT устраняло влияние экспериментального сахарного диабета в отношении эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного

кольца аорты. Дилатация сегмента аорты начиналась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе $3 \times 10^{-8} \text{M}$, а ее максимум наблюдался при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} \text{M}$ и составлял 60%, что не отличалось от контрольных показателей (рис. 4.8).

Чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов между группами не различалась (табл. 4.8).

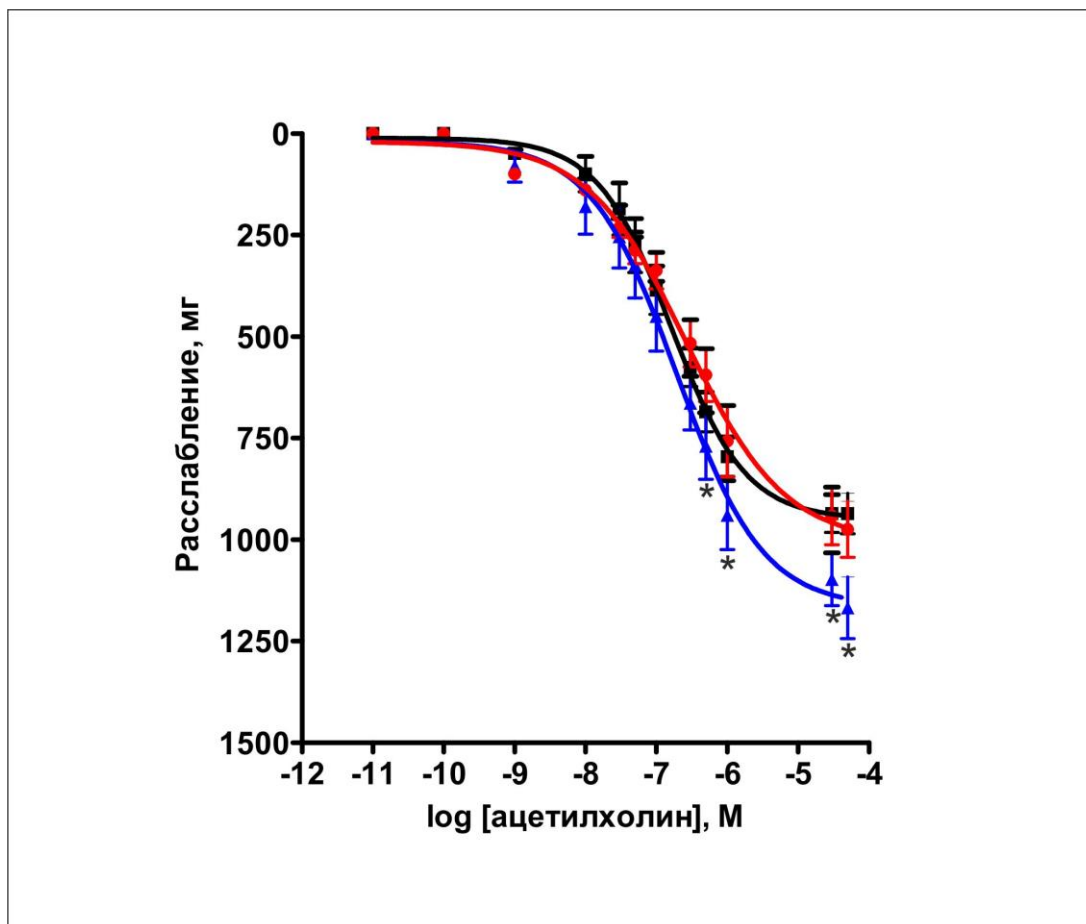


Рисунок 4.8. Влияние S-метилизотиомочевина на изменение эндотелийзависимой вазодилатации колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом
Примечание - по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – расслабление изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации ацетилхолина.

При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM). *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем

■ – группа «Контроль»; ▲ – группа «Сахарный диабет»; ● – группа «Сахарный диабет+S-MT».

Таблица 4.8. Влияние S-метилизотиомочевина на изменение чувствительности аортальных сосудов к ацетилхолину в группе животных с экспериментальным сахарным диабетом

Группа животных	EC ₅₀ , M	CI 95% EC ₅₀ , M
Контроль+S-MT (n=7)	$1,51 \times 10^{-7}$	$1,45 - 1,58 \times 10^{-7}$
Сахарный диабет+S-MT (n=7)	$2,62 \times 10^{-7}$	$2,30 - 3,00 \times 10^{-7}$

Примечание - *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n – количество животных в группе

4.1.5. Адренергическая констрикция кольца аорты крыс, адаптированных к стрессу

Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-6} М) введение α_1 - адреностимулятора фенилэфрина приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы. В группе животных, адаптированных короткими стрессорными воздействиями, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 11% от исходного напряжения, рис. 4.9), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 85% от исходного напряжения). Следовательно, в группе адаптированных животных при реакции на фенилэфрин наблюдалось не существенное снижение сократительного ответа гладкомышечных клеток артериальных сосудов. После адаптации короткими стрессорными воздействиями, чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину не отличалась от контроля (в группе «адаптация» $EC_{50} = 2,73 \times 10^{-11}$ М, против контроля $EC_{50} = 3,65 \times 10^{-11}$ М).

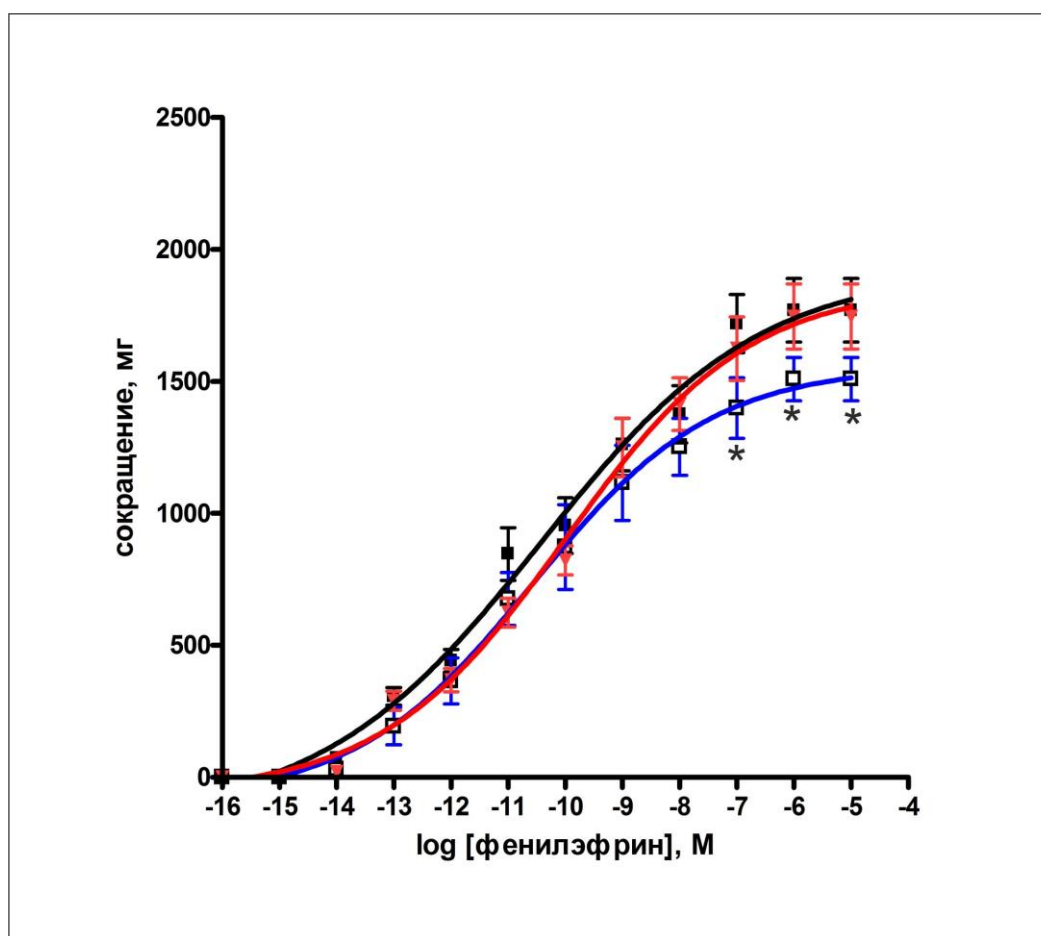


Рисунок 4.9. Влияние возрастающих концентраций фенилэфрина на величину сократительного ответа изолированного кольца аорты адаптированных животных на фоне введения S-метилизотиомочевина. Примечание: по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – процент сокращения, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина, ■ – группа «контроль», □ – «адаптация», ▼ – «адаптация+ S-метилизотиомочевина» * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем

После добавления в перфузионный раствор ингибитора iNOS S-MT в группе животных адаптированных короткими стрессорными воздействиями сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 16% от исходного напряжения), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 99% от исходного напряжения). Таким образом, инкубация сегмента аорты с S-MT возвращала сократительную реакцию гладких миоцитов, вызываемую фенилэфрином к контрольным показателям,

чувствительность кольца аорты к фенилэфрину при этом не изменялась по сравнению с контрольными показателями, EC_{50} составляла $9,92 \times 10^{-11} M$.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям не оказала влияния на интенсивность перекисного окисления липидов (I_{max}) и антиоксидантную активность (S , обратно пропорциональна суммарной хемилюминесценции) по сравнению с контрольными животными (табл. 4.9). Содержание NO_2/NO_3 в плазме крови контрольных крыс составило $29,2 \pm 1,45$ мкМ/л, а в группе адаптированных животных наблюдалось достоверное увеличение данных показателей (табл. 4.9).

Таблица 4.9. Изменение интенсивности перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности, а также концентрации нитратов/нитритов у адаптированных короткими стрессорными воздействиями животных

Группы	I_{max} , Мв	S , мв×сек	NO_2/NO_3 мкМ/л
Контроль (n=7)	$1,137 \pm 0,042$	$10,4 \pm 0,3$	$29,2 \pm 1,45$
Адаптация (n=7)	$1,163 \pm 0,042$	$11,0 \pm 0,2$	$34,2 \pm 2,7^*$

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; n-количество животных в группе

4.1.6. Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты крыс, адаптированных к стрессу

После адаптации животных короткими стрессорными воздействиями, дилатация изолированного кольца аорты, так же как и в контроле начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке $3 \times 10^{-8} M$ (составляла 11%), а максимальная ее величина достигала 70% при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} M$ ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 4.10). Однако, чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину между группами не различалась (EC_{50} составила при «адаптации» – $1,84 \times 10^{-7} M$, в контроле – $1,66 \times 10^{-7} M$). Инкубирование сегмента аорты с S-MT уменьшало эндотелийзависимую вазодилатацию. Дилатация изолированного кольца аорты начиналась при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-8} M$ и была выражена в 2 раза меньше по сравнению с контролем, а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} M$ и составлял всего лишь 43% (в контроле - 60%, $p < 0,05$). Чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов уменьшилась и составила $8,84 \times 10^{-7} M$ ($p < 0,05$, по сравнению с контролем).

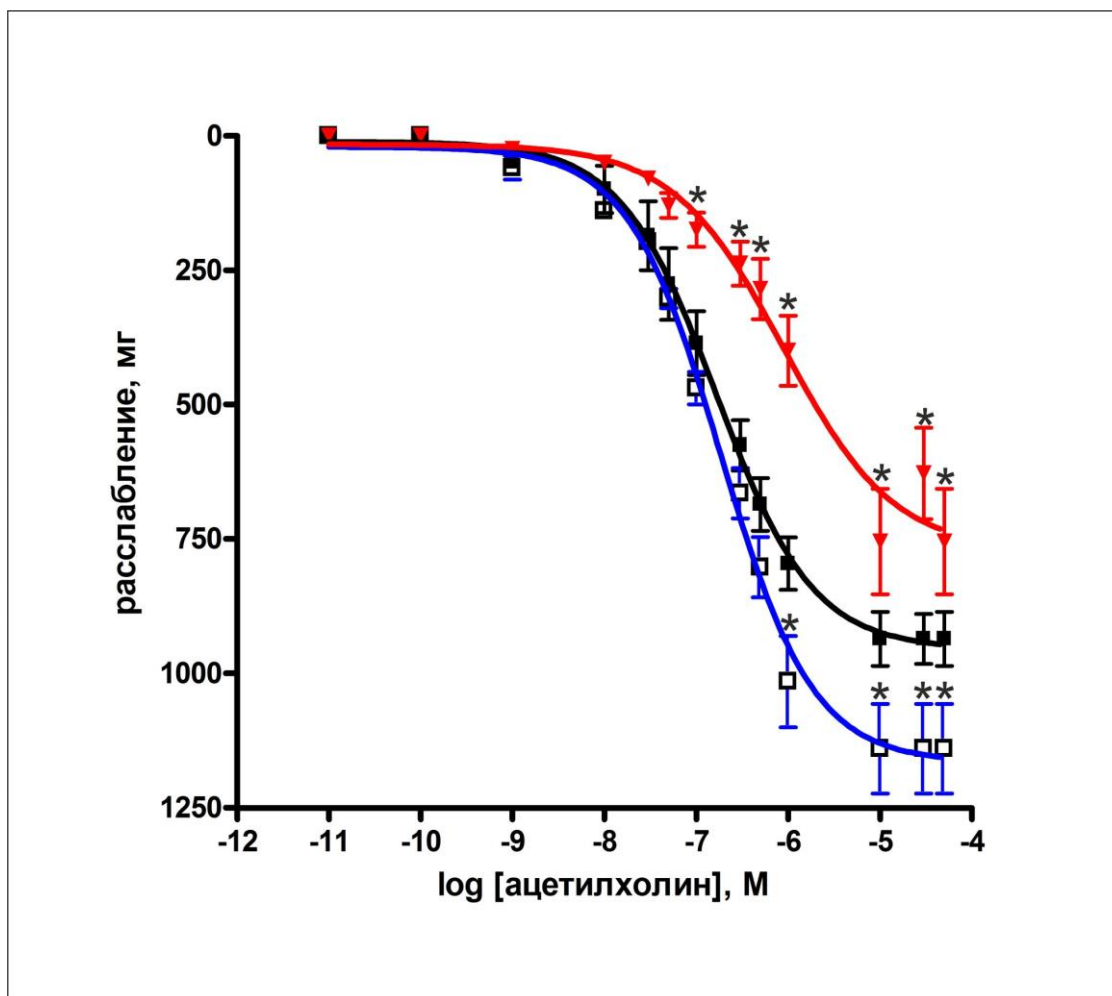


Рисунок 4.10. Влияние возрастающих концентраций ацетилхолина на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты адаптированных животных на фоне введения S-метилизотиомочевина. Примечание: по оси абсцисс – \log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина, * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем. ■ – контроль, □ – адаптация, ▼ – адаптация+ S-метилизотиомочевина

4.2 Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, адаптации к стрессу на экспрессию eNOS и iNOS в сегменте аорты

После фиксации грудной аорты в 10% растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы толщиной 5-7 мкм. Для гистологического исследования использовали следующие методы окраски: гематоксилином и эозином (для обзорной микроскопии), иммуногистохимическую с использованием поликлональных антител к iNOS (1:75) и eNOS (1:150) (Abcam, UK).

В качестве визуализирующей системы использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, UK), включающую комплекс вторичных антител и диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксилин для докрасивания препаратов.

Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили с использованием роботизированной станции по иммуногистохимическому окрашиванию препаратов Bond™ – MAX Processing Module (производства Biosystems Melbourne Pty Ltd, Австралия) в соответствии с протоколами окрашивания и рекомендациями Leica. После автоматизированного окрашивания препараты промывали под проточной водой, обезвоживали в спирте и просветляли в карбол-ксилоле и ксилоле. После этого срезы заключали в среду «Bio Mount» («Bio Optica» Milano) и накрывали покровным стеклом. Интерпретацию результатов проводили полуколичественным методом оценки интенсивности окрашивания препарата.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов кольца аорты контрольной группы животных изоформа eNOS была выраженной (+++) в эндотелии аорты, в средней и наружной оболочке сосуда экспрессия eNOS определялась от слабой (+), до умеренной (++) (рис. 4.11, А). Экспрессия iNOS в сегменте аорты не определялась (-) (рис. 4.11, В).

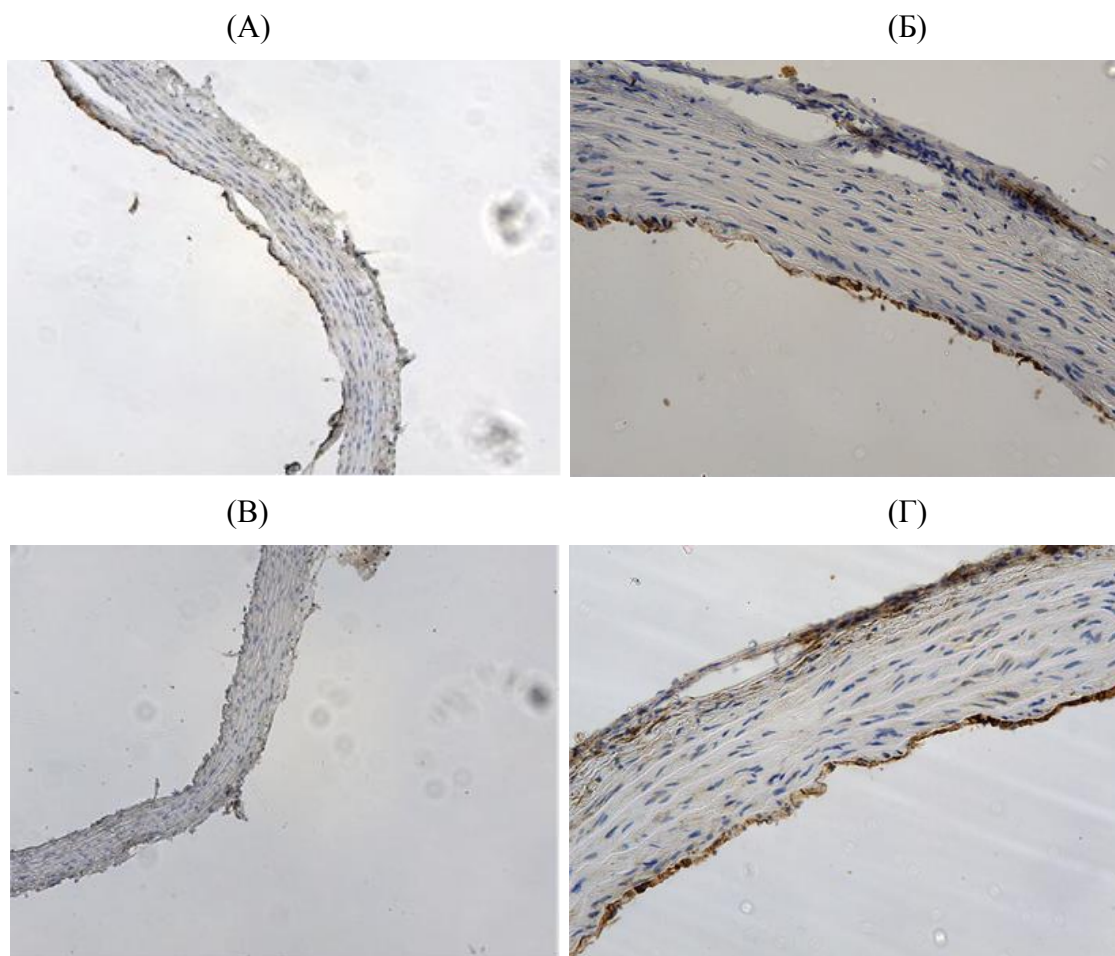


Рисунок. 4.11. Экспрессия eNOS (А) в образцах аорты крыс группы – «Контроль»; (Б) в образцах аорты крыс группы – «Стресс». Окраска Anti-enos antibody. Увеличение (А) – 100; (Б) – 200.

Экспрессия iNOS в образцах аорты крыс группы (В) – «Контроль»; (Г) – «Стресс». Окраска Anti-enos antibody. Увеличение (А) – 100; (Б) – 200.

Показанные изображения являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов с аналогичными результатами.

В группе животных «стресс» eNOS локализовалась в эндотелии аорты, в средней и наружной оболочке, ее реакция была слабой (+) (рис. 4.11, Б). В группе животных, перенесших стресс iNOS локализовалась в гладкомышечных клетках аорты и в отдельных ядрах миоцитов, ее реакция была выражена слабо (+). Напротив, в эндотелии и наружной оболочке аорты наблюдалась выраженная экспрессия iNOS (+++) (рис. 4.11, Г)

В группе животных «сахарный диабет» eNOS локализовалась в эндотелии аорты, в средней и наружной оболочке, ее реакция была слабой (+) (рис. 4.12, А). В группе животных после экспериментального сахарного диабета iNOS локализовалась в гладкомышечных клетках аорты и в отдельных ядрах миоцитов, ее реакция была выражена слабо (+). Напротив, в эндотелии и наружной оболочке аорты наблюдалась выраженная экспрессия iNOS (+++) (рис. 4.12, Б). (Исследования контрольной группы животных представлены выше).

В группе животных «Адаптация» eNOS локализовалась в эндотелии аорты, реакция была выражена от умеренной (++), до выраженной (+++) в средней и наружной оболочке, ее реакция была слабой (+) (рис. 4.12, В). В группе животных. Адаптированных к стрессу iNOS локализовалась в гладкомышечных клетках аорты, ее реакция была выражена слабо (+). Напротив, в эндотелии и наружной оболочке аорты экспрессия iNOS была умеренной (++) (рис. 4.12, Г).

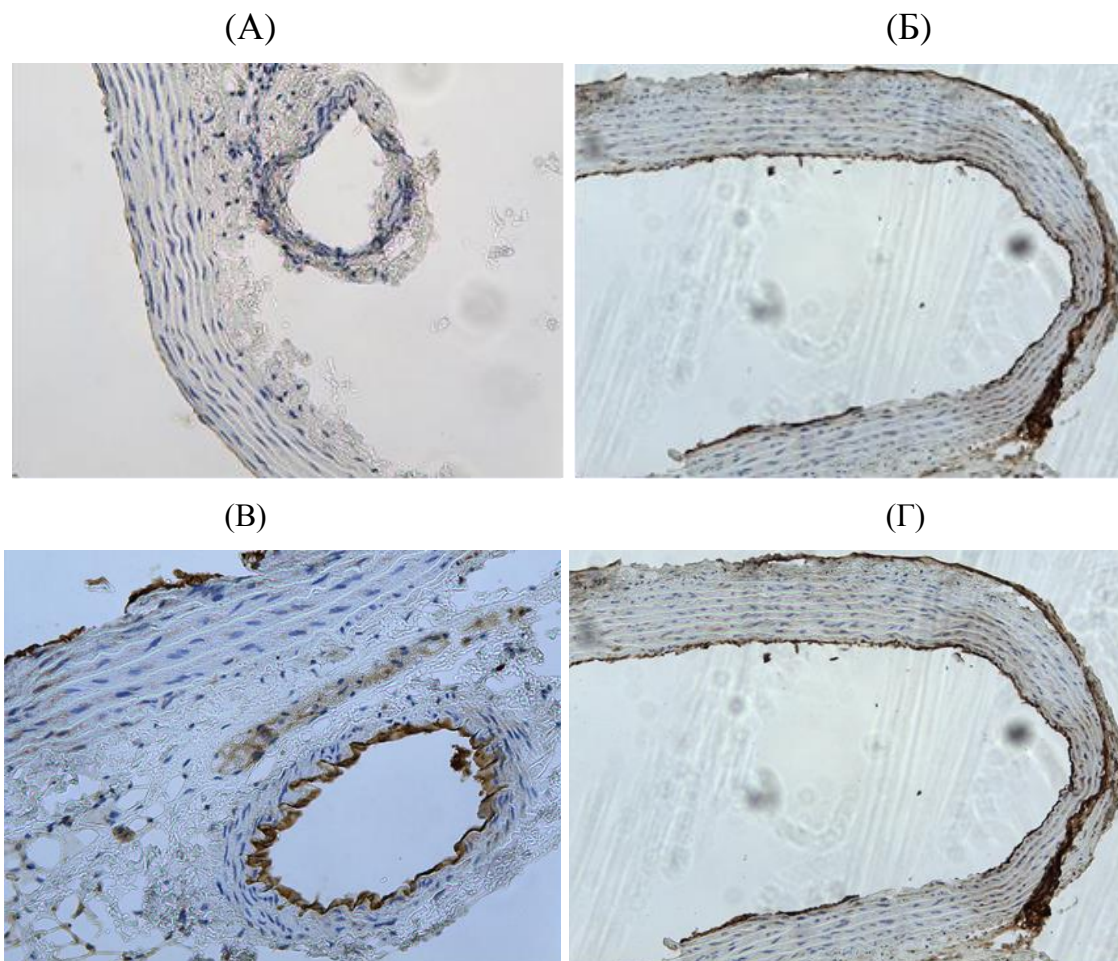


Рисунок 4.12. Экспрессия eNOS: (А) в образцах аорты крыс группы – «Сахарный диабет»; (Б) в образцах аорты крыс группы – «Адаптация». Экспрессия iNOS: (Б) в образцах аорты крыс группы – «Сахарный диабет»; (Г) в образцах аорты крыс группы – «Адаптация» Окраска Anti-enos antibody и Anti-enos antibody. Увеличение – 200

Показанные изображения являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов с аналогичными результатами.

4.3. Роль индуцибельной NO-синтазы в регуляции тонуса коронарных сосудов при иммобилизационном стрессе, экспериментальном сахарном диабете и адаптации к коротким стрессорным воздействиям

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по Лангендорфу. Сердца перфузировали раствором Кребса-Хензеля, насыщенным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), в условиях постоянного потока, при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составлявшей 6, 8, 10 и 15 мл/мин, используя установку для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных ИИ-SR типа 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованную датчиками для

измерения аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer) (рис. 4.13).

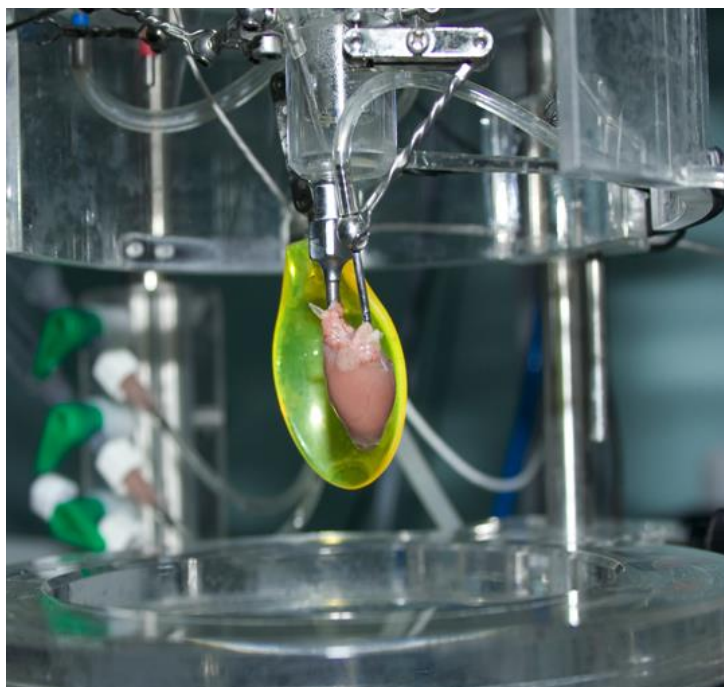


Рисунок 4.13. Установка для перфузии изолированного по Лангендорфу сердце крысы

Датчики были соединены с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА. Компьютерную регистрацию и обработку измеряемых показателей осуществляли с помощью программы ACAD (HSE, ФРГ). Сердца сокращались в постоянном ритме с частотой 240 в минуту при подаче импульсов от электростимулятора С тип - 224 (HSE-НА, ФРГ). По истечении 15 мин., необходимых для стабилизации работы сердец, регистрировали внутрижелудочковое давление и рассчитывали силовые и скоростные показатели его работы (развиваемое давление, скорость сокращения и расслабления миокарда левого желудочка).

Для изучения роли оксида азота в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли высокоселективный блокатор iNOS S-метилизотиомочевину (S-MT, 10^{-6} М, Sigma, USA). Содержание гликозилированного гемоглобина определяли методом быстрого разделения на ионообменной смоле, при помощи набора реагентов для определения гликозилированного гемоглобина «Анализ плюс». Концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови определяли диагностическим набором C-Reactive Protein (CRP), BioSystems (Испания) по инструкции производителя.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%;75%]. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p < 0,05$).

В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом уровень глюкозы в крови составил $26,1 \pm 1,7$ ммоль/л, то есть в 5 раз выше, чем у контрольных крыс ($5,7 \pm 1,1$ ммоль/л, $p < 0,05$). В группе крыс «стресс+сахарный диабет» концентрация глюкозы в крови составляла $25,9 \pm 1,5$ ммоль/л и была сопоставима с таковой в группе «сахарный диабет». В группах «сахарный диабет» и «сахарный диабет+стресс» выявлялись глюкозурия и кетонурия. В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом

выживаемость составляла 70%. По истечении 14-ти дней после введения стрептозоцина у крыс масса тела снижалась в среднем на 19% и составляла $148 \pm 3,1$ грамм против $183 \pm 6,3$ грамм до начала эксперимента.

В сердцах контрольных животных ступенчатое повышение ОСКП приводило к закономерному увеличению коронарного перфузионного давления на 43% - при увеличении ОСКП от 6 до 8 мл/мин, на 32% - при ее увеличении от 8 до 10 мл/мин, и на 70% при увеличении ОСКП от 10 до 15 мл/мин, что свидетельствует о повышении тонуса сосудов сердца. В сердцах крыс, перенесших стресс, динамика коронарного перфузионного давления при увеличении ОСКП была такой же, как в контроле. Однако, коронарное перфузионное давление, определяемое при каждом уровне ОСКП (6, 8, 10, 15 мл/мин) было меньше, чем в контроле на 15, 17, 20 и 21%, соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с группой «контроль», рис. 4.14, А). Снижение сопротивления сосудов сердца в группе животных, перенесших стресс, сопровождалось уменьшением как развиваемого внутрижелудочкового давления при всех уровнях ОСКП в среднем на 38% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой животных, табл. 4.10), так и первой производной (dP/dt) при всех уровнях перфузионного давления на 38%-44% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, табл. 4.12). Эти данные указывают на постстрессорное снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда.

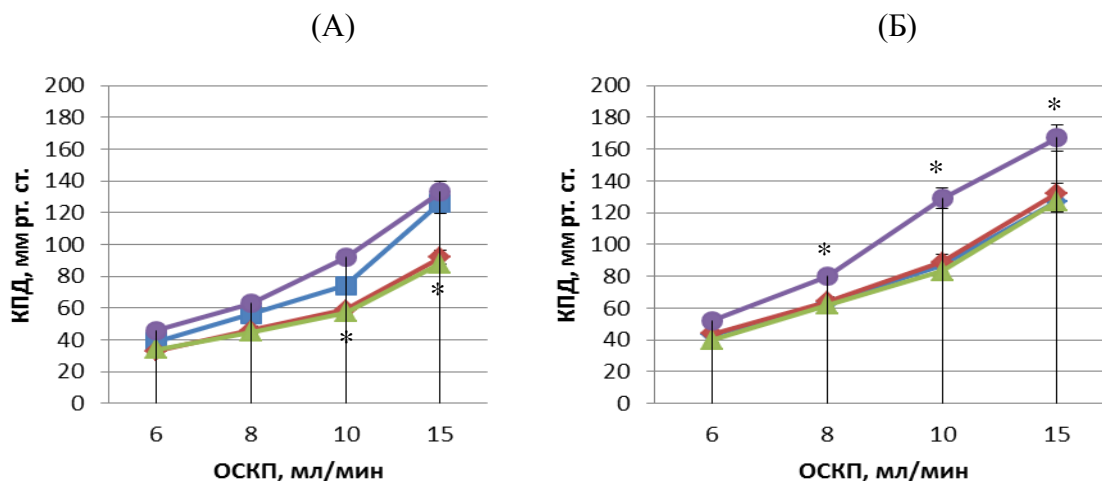


Рисунок 4.14. Изменение коронарного перфузионного давления (КПД) после 6-часового иммобилизационного стресса, стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета и их комбинированного воздействия (А); на фоне блокады индуцированной NO-синтазы (Б).

Примечание: по оси абсцисс – коронарное перфузионное давление в мм рт. ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока (ОСКП) в мл/мин. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

■ – группа «контроль», ▲ – «сахарный диабет», ◆ – «стресс»; ● – «сахарный диабет+стресс»

В изолированных сердцах крыс группы «сахарный диабет», так же как и после стресса, наблюдалось снижение коронарного перфузионного давления в диапазоне ОСКП от 8 до 15 мл/мин в среднем на 23% ($p < 0,05$, по сравнению с группой «контроль», рис. 4.14, А). При этом развиваемое внутрижелудочковое давление при всех уровнях ОСКП снижалось в среднем на 26% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой животных, табл. 4.10), наряду со снижением первой производной $+dP/dt$ в среднем на 34%, и $-dP/dt$ в среднем на 29%, $p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 4.12). Таким образом, как сахарный диабет, так и иммобилизационный стресс приводили к сходным изменениям тонуса сосудов и сократительной функции миокарда.

Таблица 4.10. Характер изменения **РВД** после иммобилизационного стресса, сахарного диабета и стресса, развивающегося на фоне сахарного диабета

Группа		Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль (n=20)	Медиана, %	35,0	57,0	70,0	90,0
	Размах (Min-Max), %	28,0-53,0	40,0-89,0	40,0-104,0	50,0-155,0
	95% ДИ для медианы, %	32,0;38,0	51,0;62,0	62,0;78,0	79,0;101,0
	25-75 процентиль, %	32,0;41,0	37,0;63,0	60,0;81,0	83,0;102,0
Стресс (n=13)	Медиана, %	22,0 p=0,001	36,0 p=0,003	45,0 p=0,01	60,0 p=0,0002
	Размах (Min-Max), %	15,0-36,0	20,0-43,0	30,0-60,0	30,0-70,0
	95% ДИ для медианы, %	18,0-26,0	32,0-40,0	40,0-50,0	53,0-67,0
	25-75 процентиль, %	20,0;26,0	30,0;38,0	40,0;50,0	50,0;70,0
Сахарный диабет (n=8)	Медиана, %	31,0 p=0,01	42,0 p=0,001	52,0 p=0,0007	60,0 p=0,004
	Размах (Min-Max), %	13,0-40,0	25,0-60,0	26,0-75,0	30,0-80,0
	95% ДИ для медианы, %	23,0-38,0	34,0-49,0	40,0-63,0	49,0-71,0
	25-75 процентиль, %	27,0;38,0	40,0;46,0	47,0;60,0	59,0;60,0
Сахарный диабет+стресс (n=8)	Медиана, %	45,0	56,0	79,0	100,0
	Размах (Min-Max), %	26,0-72,0	35,0-86,0	60,0-100,0	76,0-119,0
	95% ДИ для медианы, %	31,0-59,0	42,0-69,0	66,0-92,0	85,0-114,0
	25-75 процентиль, %	34,0;53,0	56,0;78,0	68,0;89,0	87,0;110,0

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

Таблица 4.11. Характер изменения **РВД** после иммобилизационного стресса, сахарного диабета и стресса, развивающегося на фоне сахарного диабета в условиях интракоронарного введения блокатора индуцибельной NO-синтазы SM-T

Группа		Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль+S-MT (n=20)	Медиана, %	43,0	62,0	90,0	126,0
	Размах (Min-Max), %	36,0-53,0	45,0-80,0	63,0-100,0	110,0-150,0
	95% ДИ для медианы, %	39,0-47,0	52,0-71,0	80,0-100,0	118,0-134,0
	25-75 процентиль, %	38,0;47,0	53,0;75,0	76,0;100,0	123,0;134,0
Стресс +S-MT (n=13)	Медиана, %	45,0	64,0	98,0	132,0
	Размах (Min-Max), %	35,0-50,0	49,0-74,0	74,0-100,0	125,0-150,0
	95% ДИ для медианы, %	41,0-49,0	56,0-72,0	88,0-108,0	124,0-140,0
	25-75 процентиль, %	44,0;47,0	59,0;70,0	81,0;100,0	126,0;134,0
Сахарный диабет+S-MT (n=8)	Медиана, %	39,0	55,0	90,0	128,0
	Размах (Min-Max), %	34,0-49,0	50,0-85,0	70,0-109,0	100,0-152,0
	95% ДИ для медианы, %	34,0-44,0	42,0-68,0	76,0-104,0	113,0-143,0
	25-75 процентиль, %	37,0;44,0	51,0;70,0	78,0;103,0	120,0;135,0
Сахарный диабет+стресс +S-MT (n=8)	Медиана, %	51,0	88,0	130,0	169,0
		p=0,006	p=0,007	p=0,001	p=0,004
	Размах (Min-Max), %	40,0-63,0	52,0-95,0	79,0-156,0	145,0-196,0
	95% ДИ для медианы, %	44,0-58,0	74,0-101,0	107,0-153,0	155,0-182,0
	25-75 процентиль, %	47,0;59,0	66,0;91,0	100,0;146,0	161,0;176

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль+S-MT»; n-количество животных в группе.

Таблица 4.12. Характер изменения первой производной (dP/dt) после имобилизационного стресса, сахарного диабета и стресса, развивающегося на фоне сахарного диабета

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин				
		6	8	10	15	
Контроль (n=20)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	1320	1932	2156	2852
		Размах (Min-Max), %	1202-1562	1655-2518	1220-2574	1552-3883
		95% ДИ для медианы, %	1267-1372	1846-2017	2003-2308	2604-3099
		25-75 процентиль, %	1261;1402	1893;1961	2016;2346	2558;2892
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	-861	-1332	-1532	-1850
		Размах (Min-Max), %	-1088;-617	-1657;-913	-1933;-1007	-2210;-1281
		95% ДИ для медианы, %	-922;-799	-1467;-1196	-1658;-1406	-1967;-1732
Стресс (n=13)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	-948;-767	-1413;-1105	-1692;-1348	-1998;-1798
		Медиана, %	812; p=0,003	966; p=0,001	1250; p=0,0007	1576; p=0,0005
		Размах (Min-Max), %	422-1040	715-1202	829-1757	975-2193
		95% ДИ для медианы, %	692-931	866-1066	1075-1425	1874-2217
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	674;885	861;1088	985;1398	1205;2040
		Медиана, %	-548; p=0,0007	-731; p=0,01	-954; p=0,003	-1145; p=0,0001
		Размах (Min-Max), %	-780;-325	-910;-522	-1251;-715	-1657;-740
	95% ДИ для медианы, %	-636;-459	-816;-645	-1079;-829	-1321;-969	
	25-75 процентиль, %	-640;-479	-835;-593	-1108;-754	-1336;-959	

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

Продолжение таблицы 4.12

Сахарный диабет (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	947; p=0,002	1278; p=0,0005	1503; p=0,003	1610; p=0,001
		Размах (Min-Max), %	745-1170	1105-1657	1105-2112	1186-2258
		95% ДИ для медианы, %	851-1042	1137-1418	1260-1746	1302-1911
		25-75 процентиль, %	895;967	1162;1289	1391;1539	1467;1636
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	-625; p=0,001	-974; p=0,001	-1013; p=0,001	-997; p=0,001
		Размах (Min-Max), %	-960;-601	-1332;-812	-1430;-735	-1439;-896
95% ДИ для медианы, %		-745;-506	-1156;-792	-1184;-842	-1138;-855	
Сахарный диабет+стресс (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	-811;-613	-991;-885	-1052;-914	-1055;-970
		Медиана, %	1153	1511	1949	2875
		Размах (Min-Max), %	764-1787	910-2258	1267-2778	1787-3460
		95% ДИ для медианы, %	806-1500	1129-1893	1452-2445	2168-3582
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	966;1478	1446;1779	1689;2469	2615;2973
		Медиана, %	-863	-1170	-1527	-1687
Размах (Min-Max), %		-1283;-536	-1430;-692	-1756;-860	-2425;-1170	
	95% ДИ для медианы, %	-1125;-660	-1402;-937	-1821;-1232	-2383;-992	
	25-75 процентиль, %	-984;-722	-1299;-950	-1576;-1178	-2339;-1186	

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

Таблица 4.13. Характер изменения первой производной (dP/dt) после иммобилизационного стресса, сахарного диабета и стресса, развивающегося на фоне сахарного диабета в условиях интракоронарного введения блокатора индукцибельной NO-синтазы SM-T

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин				
Контроль+S-MT (n=20)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	6	8	10	15
		Размах (Min-Max), %	1136	1477	1898	2359
		95% ДИ для медианы, %	942-1348	1017-1966	1348-2599	1785-3087
		95% ДИ для медианы, %	1048-1223	1269-1685	1601-2193	2101-2617
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	1069;1170	1328;1708	1577;2158	2275;2434
		Медиана, %	-747	-1072	-1251	-1513
		Размах (Min-Max), %	-1047;-636	-1397;-764	-1740;-1001	-2197;-958
		95% ДИ для медианы, %	-874;-619	-1254;-889	-1524;-977	-1979;-1046
		25-75 процентиль, %	-895;-731	-1205;-1039	-1543;-1112	-1798;-1227
		Медиана, %	1348	1455	1515	1771
Стресс +S-MT (n=13)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Размах (Min-Max), %	755-2128	861-2843	926-2680	1251-3525
		95% ДИ для медианы, %	937-1758	862-2047	988-2041	1117-2424
		25-75 процентиль, %	1142-1599	1137-1561	1112-1633	1627-1958
		Медиана, %	-946	-1106	-1135	-1186
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Размах (Min-Max), %	-1300;-325	-1819;-533	-1698;-736	-1868;-975
		95% ДИ для медианы, %	-1282;-609	-1548;-663	-1462;-806	-1496;-876
		25-75 процентиль, %	-1079;-782	-1207;-833	-1237;-968	-1250;-1131

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль+S-MT»; n-количество животных в группе.

Продолжение таблицы 4.13

Сахарный диабет+S-MT (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	1155	1455	1787	1980
		Размах (Min-Max), %	910-1641	1040-2437	991-2541	1137-2469
		95% ДИ для медианы, %	837-1437	968-1941	1270-2303	1490-2470
		25-75 процентиля, %	1024-1405	1356-1747	1507-1892	1787-2317
		Медиана, %	-667	-837	-1031	-987
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Размах (Min-Max), %	-1365;-471	-1625;-666	-1641;-761	-1267;-877
		95% ДИ для медианы, %	-1023;-311	1227;-445	-1370;-639	-1123;-780
		25-75 процентиля, %	-1060;-639	-1251;-762	-1316;-866	-1211;-901
		Медиана, %	1430	2031	2258	2534
		Размах (Min-Max), %	1007-2453	1267-3282	1495-3184	1478-3461
Сахарный диабет+стресс +S-MT (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	95% ДИ для медианы, %	1070-1789	1561-2500	1832-2683	2023-3044
		25-75 процентиля, %	1381;1832	1608;2404	1771;2567	2242;2365
		Медиана, %	-1170	-1283	-1300	-1202
		Размах (Min-Max), %	-1646;-746	-1887;-762	-2274;-910	-2360;-893
		95% ДИ для медианы, %	-1388;-951	-1533;-1032	-1621;-978	-1553;-850
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиля, %	-1332;-991	-1478;-1202	-1722;-1186	-1641;-1134

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль+S-MT»; n-количество животных в группе.

Иммобилизационный стресс, воспроизведенный у крыс на фоне сахарного диабета, не приводил к изменению коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда. Значения перфузионного давления при всех уровнях ОСКП (рис. 4.14, А), развиваемое внутрижелудочковое давление и первая производная (dP/dt) были сопоставимы с контрольными показателями (табл. 4.11).

Введение в перфузионный раствор высокоселективного блокатора индуцированной NO-синтазы S-метилизотиомочевина не приводило к изменению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции сердца контрольных крыс (рис. 4.14, Б). Подавление активности iNOS в сердцах крыс, перенесших иммобилизационный стресс, приводило к восстановлению коронарного перфузионного давления при всех уровнях ОСКП до контрольных показателей (рис. 4.14, Б). Следовательно, S-MT устранял постстрессорную гиперпродукцию оксида азота, образуемого индуцированной NO-синтазой. Показатели развиваемого внутрижелудочкового давления при этом не отличались от таковых в группе «контроль» (табл. 4.12), однако показатели первой производной (dP/dt) все же оставались сниженными при коронарном перфузионном давлении 8, 10 и 15 мм рт. ст. (+ dP/dt на 22, 29 и 29% соответственно, и - dP/dt на 15, 23, 32% соответственно, $p < 0,05$), по сравнению с контролем (табл. 4.13). Таким образом, NO, образуемый индуцированной NO-синтазой при длительном иммобилизационном стрессе, играет важную роль в механизмах ослабления миогенного тонуса коронарных сосудов и снижения сократительной функции миокарда.

Подавление активности iNOS в изолированных сердцах крыс групп «сахарный диабет» и «стресс» приводило к тому, что величины коронарного перфузионного давления и развиваемого внутрижелудочкового давления не отличались от таковых в контроле (рис. 4.14, Б). Однако в группе «сахарный диабет» показатели первой производной (dP/dt) все же оставались сниженными при ОСКП, составлявшей 8, 10 и 15 мл/мин. (+ dP/dt на 17, 18 и 29% соответственно, - dP/dt на 15, 21, 26% соответственно, $p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 4.13). Этот факт позволяет предположить, что важнейшим механизмом ослабления миогенного тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете является гиперпродукция оксида азота индуцированной NO-синтазой. Добавление в перфузионный раствор S-MT приводило к повышению коронарного перфузионного давления в группе «сахарный диабет+стресс» при ОСКП 6, 8, 10 и 15 мл/мин на 33, 43, 74 и 32%, соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 4.14, Б). В то же время, блокада iNOS не оказывала влияния на величины развиваемого внутрижелудочкового давления и показатели первой производной (dP/dt) (табл. 4.12, 4.13). В сердцах животных, адаптированных к стрессу, коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление не отличались от таковых в контроле. Добавление в перфузионный раствор S-MT не сопровождалось изменениями коронарного перфузионного давления и сократительной функции сердца адаптированных к стрессу животных (табл. 4.14, 4.15). В группе животных, перенесших стресс на фоне предварительной адаптации («адаптация+стресс»), коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление не отличалось от таковых, выявленных в сердцах контрольных животных. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора S-MT не оказывало влияния на изменение коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда в этой группе животных (табл. 4.14, 4.15).

Таблица 4.14. Изменение коронарного перфузионного давления в группах животных адаптированных к стрессу на фоне интракоронарного введения S-метилизотиомочевины

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль (n=20)	Медиана, %	38,5	52,0	66,0	125,0
	Размах (Min-Max), %	33,0-54,0	46,0-66,0	52,0-127,0	80,0-170,0
	95% ДИ для медианы, %	36,0-41,0	47,0-56,0	57,0-74,0	114,0-136,0
	25-75 процентиль, %	35,0-44,0	48,0-61,0	60,0-80,0	110,0-134,0
Адаптация (n=8)	Медиана, %	37,0	50,0	68,0	120,0
	Размах (Min-Max), %	30,0-40,0	39,0-56,0	44,0-77,0	100,0-133,0
	95% ДИ для медианы, %	35,0-39,0	47,0-53,0	63,0-73,0	114,0-126,0
	25-75 процентиль, %	35,0-37,0	50,0-53,0	60,0-70,0	115,0-125,0
Адаптация+стресс (n=8)	Медиана, %	35,0	62,0	80,0	118,0
	Размах (Min-Max), %	25,0-41,0	40,0-92,0	55,0-100,0	95,0-139,0
	95% ДИ для медианы, %	31,0-39,0	48,0-75,0	66,0-93,0	106,0-129,0
	25-75 процентиль, %	32,0-37,0	50,0-69,0	72,0-85,0	110,0-126,0
Адаптация+S-МТ (n=8)	Медиана, %	40,0	54,0	79,0	153,0
	Размах (Min-Max), %	36,0-55,0	48,0-90,0	65,0-156,0	130,0-185,0
	95% ДИ для медианы, %	35,0-45,0	43,0-65,0	55,0-103,0	139,0-166,0
	25-75 процентиль, %	39,0-48,0	49,0-67,0	66,0-102,0	142,0-166,0
Адаптация+стресс+S-МТ (n=13)	Медиана, %	40,0	60,0	85,0	149,0
	Размах (Min-Max), %	36,0-54,0	52,0-68,0	83,0-99,0	140,0-165,0
	95% ДИ для медианы, %	35,0-44,0	54,0-65,0	79,0-89,0	111,0-157,0
	25-75 процентиль, %	38,0-41,0	55,0-67,0	83,0-93,0	145,0-158

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

Таблица 4.15. Изменение развиваемого внутрижелудочкового давления в группах животных адаптированных к стрессу

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль (n=20)	Медиана, %	35,0	57,0	70,0	90,0
	Размах (Min-Max), %	28,0-53,0	40,0-89,0	40,0-104,0	50,0-155,0
	95% ДИ для медианы, %	32,0;38,0	51,0;62,0	62,0;78,0	79,0;101,0
	25-75 процентиль, %	32,0;41,0	37,0;63,0	60,0;81,0	83,0;102,0
Адаптация (n=8)	Медиана, %	36,0	45,0	64,0	85,0
	Размах (Min-Max), %	26,0-45,0	40,0-67,0	50,0-82,0	70,0-110,0
	95% ДИ для медианы, %	33,0-39,0	39,0-51,0	57,0-71,0	77,0-93,0
	25-75 процентиль, %	30,0;40,0	40,0;56,0	55,0;70,0	80,0;100
Адаптация+стресс (n=8)	Медиана, %	29,0	49,0	65,0	90,0
	Размах (Min-Max), %	25,0-50,0	40,0-60,0	55,0-90,0	88,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	21,0-36,0	43,0-55,0	55,0-75,0	87,0-93,0
	25-75 процентиль, %	26,0;36,0	40,0;55,0	59,0;73,0	90,0;90,0
Адаптация+S-MT (n=8)	Медиана, %	34,0	48,0	62,0	80,0
	Размах (Min-Max), %	30,0-51,0	40,0-70,0	50,0-76,0	70,0-90,0
	95% ДИ для медианы, %	29,0-39,0	41,0-54,0	55,0-68,0	76,0-84,0
	25-75 процентиль, %	31,0;39,0	45,0;54,0	60,0;70,0	80,0;82,0
Адаптация+стресс+S-MT (n=13)	Медиана, %	31,0	46,0	58,0	71,0
	Размах (Min-Max), %	20,0-42,0	30,0-70,0	40,0-93,0	55,0-105,0
	95% ДИ для медианы, %	23,0-39,0	36,0-55,0	43,0-72,0	56,0-84,0
	25-75 процентиль, %	20,0;41,0	40,0;51,0	50,0;66,0	65,0;90,0

Примечание - $p < 0,05$ по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

4.3.1. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, их сочетания, а также адаптации к коротким стрессорным воздействиям на изменение системного артериального давления у крыс

Артериальное давление (АД) у крыс определяли неинвазивным методом с использованием системы NIBP (non-invasive blood pressure) фирмы Panlab. Крыс помещали в прозрачный пенал и закрепляли в автоматическом нагревателе ($t = 29^{\circ}\text{C}$), подсоединяли датчик-манжету к хвосту, который располагался в проекции хвостовой артерии (рис. 4.15).



Рисунок 4.15. Установка для измерения системного артериального давления у крыс неинвазивным методом

После 20 минут проводили измерения. Для получения достоверных результатов животных предварительно адаптировали к нахождению в пеналах в течение 2-х недель по 15-20 минут ежедневно. Затем измеряли частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое, а также среднее артериальное давление (ЧСС, САД, ДАД и СрАД, соответственно).

В группе животных, перенесших стресс и экспериментальный сахарный диабет наблюдалось снижение среднего АД на 13 и 9% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контрольными показателями табл. 4.16). В группах животных, перенесших стресс на фоне предварительной адаптации измеряемые показатели не отличались от контрольных значений. Таким образом, адаптация полностью предупредила постстрессорное снижение системного артериального давления. Гипотензия, наблюдаемая при иммобилизационном стрессе и экспериментальном сахарном диабете, может быть обусловлена гиперпродукцией NO, синтезируемого iNOS. Последовательность событий представлена на схеме 1.

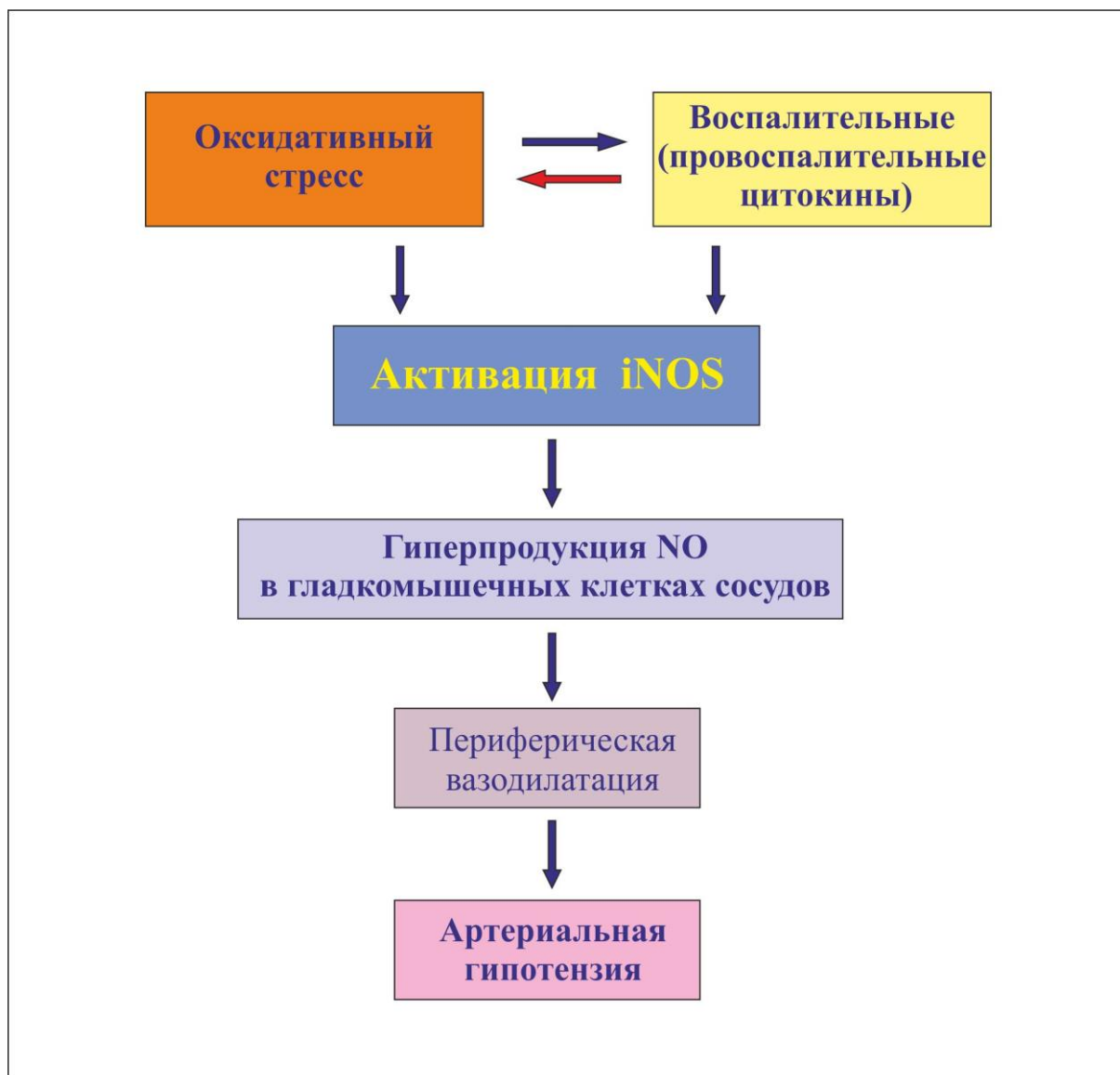


Схема 4.1. Механизм формирования постстрессорной артериальной гипотензии у крыс

Таблица 4.16. Влияние иммобилизационного стресса, экспериментального сахарного диабета и адаптации к стрессу на изменение частоты сердечных сокращений (ЧСС); систолического давления (СД); диастолического давления (ДД); среднего артериального давления (САД)

Группа	Показатель	ЧСС (уд/мин)	СД (мм рт.ст)	ДД (мм рт.ст)	САД (мм рт.ст)
Контроль (n=8)	Медиана, %	302,0	126,0	109,0	114,0
	Размах (Min-Max), %	279,0-325,0	116,0-135,0	102,0-118,0	106,0-123,0
	95% ДИ для медианы, %	288,0-314,0	121,0-130,0	103,0-113,0	109,0-117,0
	25-75 процентиль, %	293,0;317,0	124,0;128,0	107,0;112,0	112,0;118,0
Стресс (n=7)	Медиана, %	450,0	116,0	89,0	99,0
		p=0,0002	p=0,003	p=0,007	p=0,002
	Размах (Min-Max), %	322,0-469,0	107,0-136,0	80,0-97,0	91,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	394,0-505,0	107,0-125,0	84,0-94,0	96,0-102,0
Сахарный диабет (n=8)	25-75 процентиль, %	371,0;464,0	110,0;121,0	87,0;91,0	96,0;100,0
	Медиана, %	334,0	111,0	100,0	104,0
			p=0,005	p=0,02	p=0,0003
	Размах (Min-Max), %	310,0-377,0	94,0-126,0	73,0-105,0	80,0-109,0
Адаптация (n=6)	95% ДИ для медианы, %	311,0-356,0	103,0-118,0	91,0-108,0	95,0-111,0
	25-75 процентиль, %	320,0;370,0	105,0;115,0	92,0;101,0	98,0;108,0
	Медиана, %	360,0	126,0	111,0	117,0
	Размах (Min-Max), %	324,0-420,0	120,0-131,0	106,0-118,0	112,0-121,0
Адаптация+стресс (n=7)	95% ДИ для медианы, %	322,0-397,0	121,0-130,0	105,0-115,0	112,0-120,0
	25-75 процентиль, %	335,0;385,0	122,0;127,0	108,0;117,0	113,0;120,0
	Медиана, %	368,0	125,0	113,0	115,0
	Размах (Min-Max), %	325,0-410,0	119,0-130,0	105,0-119,0	113,0-121,0
	95% ДИ для медианы, %	339,0-396,0	120,0-129,0	108,0-117,0	112,0-117,0
	25-75 процентиль, %	339,0;388,0	120,0;127,0	109,0;116,0	114,0;119,0

Примечание - p<0,05 по сравнению с величинами группы «Контроль», n-количество животных в группе.

4.3.2. Анализ изоферментного спектра NOS в миокарде крыс при иммобилизационном стрессе, экспериментальном сахарном диабете, их сочетании, а также адаптации к коротким стрессорным воздействиям

Определение экспрессии генов Nos2 (iNOS), Nos3 (eNOS), а также референсных генов Tbp1, Rplp1 и Hprt1 проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Концентрацию выделенных образцов РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Качество образцов РНК контролировали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Значения параметра RIN (RNA integrity number) для всех образцов РНК были не ниже 7.

Для Nos2 (iNOS), Nos3 (eNOS), а также референсных генов Tbp1, Rplp1 и Hprt1 были подобраны пары праймеров с помощью программ Primer3 (v. 0.4.0) и Primer-BLAST. Специфичность амплификации проверяли по электрофоретической подвижности ПЦР-продуктов в 2,5% агарозном геле. Список последовательностей праймеров представлен в таблице 4.17. Реакцию обратной транскрипции проводили для 1 мкг РНК с использованием коммерческого набора «Синтол» с 2,5X буфером, содержащим дНТФ (Россия). За накоплением продукта в процессе ПЦР-РВ следили по увеличению флуоресцентного сигнала интеркалирующего красителя SYBR Green I (Invitrogen).

Был проведен анализ изменения экспрессии нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной NO-синтаз под воздействием 6-часового иммобилизационного стресса, гипергликемии, сочетания гипергликемии и стресса, а также при адаптации короткими стрессорными воздействиями в стенке левого желудочка сердца крыс методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Таблица 4.17. Список использованных в работе праймеров.

Название гена	Последовательность праймера*	Эффективность амплификации	Длина продукта, п.о.
Nos2	F: TTGGTGAGGGGACTGGACTTTT	2,30±0,30	90
	R: TTCTCCGTGGGGCTTGTAGTTG		
Nos3	F: ATCAGCAACGCTACCACGA	1,90±0,16	173
	R: GGAAGAAGATTGTCAGGAACCA		
	R: TTGGAGAGGCAGATACAGGAG		
Hprt1	F: GTCATCAGCGAAAGTGGAAA	1,75±0,25	201
	R: AAGGGACGCAGCAACAGAC		
Rplp1	F: TCCACAACATGGCTTCTGTC	1,97±0,13	191
	R: GCAGATGAGGCTTCCAATGT		
Tbp1	F: ACCGTGAATCTTGGCTGTAA	2,02±0,13	122
	R: GCAGTTGTTTCGTGGCTCTCT		
Nfkb	R: GGACGACACCTCTACACATAGCA L: CATCTTCTCCAGCCTTCTCCCA	1,93±0,21	144

*Последовательности праймеров написаны в направлении от 5' к 3' концу. F- прямой праймер, R- обратный праймер.

Для каждой группы образцов, нормированные значения экспрессии (NRQ) целевых генов рассчитывались по следующей формуле (1) с нормировкой на три референсных гена Hprt1, Rplp1, Tbp1, валидированных согласно рекомендациям [9]:

$$NRQ_{ген} = \frac{E_{ген}^{Ct_{ген}}}{\sqrt{E_{ref,ген1}^{Ct_1} \times E_{ref,ген2}^{Ct_2} \times E_{ref,ген3}^{Ct_3}}} \quad (1),$$

где E – эффективность амплификации продукта;
NRQ – нормированные значения экспрессии;
Ct – нормировка по референсному гену.

При расчете изменения экспрессии при всех исследуемых группах, значения нормированных уровней экспрессии относили к значениям контрольной группы.

По результатам оценки изменения экспрессии генов, кодирующих все три NO-синтазы, можно сделать вывод, что во всех исследуемых группах (стресс, гипергликемия, гипергликемия в сочетании со стрессом и адаптация короткими стрессорными воздействиями) происходит активация транскрипции Nos2. Уровень экспрессии двух других генов, кодирующих нейрональную и эндотелиальную NO-синтазу, остается неизменным в условиях статистической погрешности. При расчете изменения экспрессии методом ПЦР в реальном времени у крыс при 6-часовом иммобилизационном стрессе, 14-ти дневной гипергликемии и их сочетании, а также при адаптации значения нормированных уровней экспрессии относили к значениям контрольной группы. В группах животных перенесших 6-ти часовой стресс и 14-ти дневную гипергликемию уровень транскриптов, кодирующих, индуцированную NO-синтазу в миокарде увеличивался в равной степени в 6 и 5,8 раз соответственно (рис. 4.16). При комбинированном воздействии гипергликемии и стресса происходила активация транскрипции iNOS в 51 раз (рис. 4.16). Экспрессия генов iNOS после адаптации к коротким стрессорным воздействиям была увеличена в 8,6 раза.

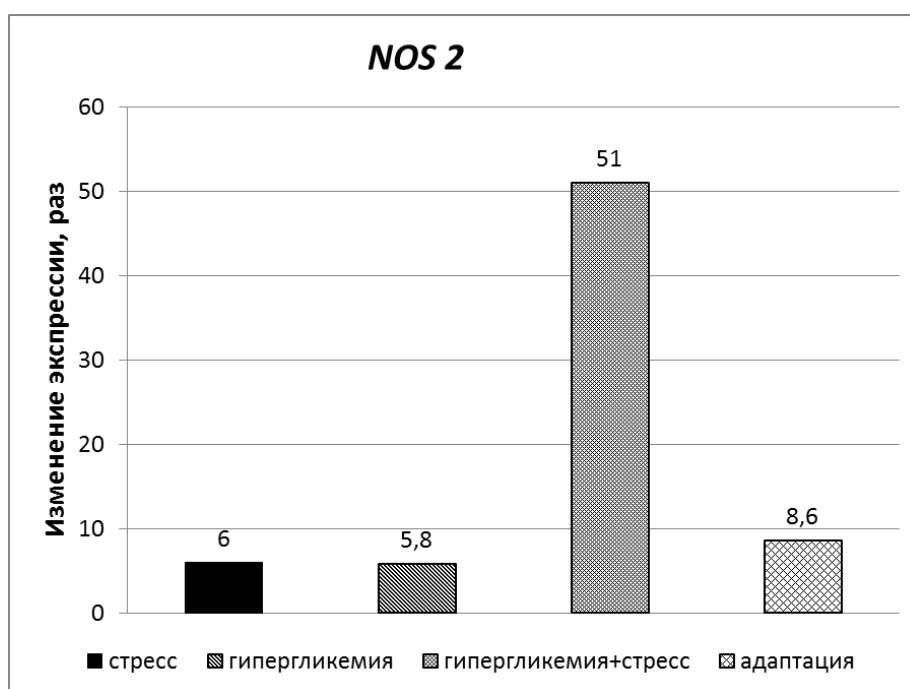


Рисунок 4.16. Изменение экспрессии генов Nos2 при иммобилизационном стрессе, стрептозоцин-индуцированной гипергликемии (экспериментальный сахарный диабет), сочетании гипергликемии (экспериментального сахарного диабета) и стресса, а также при адаптации к коротким стрессорным воздействиям в миокарде крыс. Примечание: стандартное отклонение приведено для n=5 в каждой группе

4.3.3. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета и адаптации к стрессу на показатели концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка, NO²/NO³-, продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность

После окончания эксперимента животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Сыворотку крови распределяли по эпиндорфам и хранили при -20° С. В сыворотке крови определяли концентрации NOS, интерлейкина 1 β , С-реактивного белка.

Концентрацию ферментов iNOS и eNOS в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы и реагенты для iNOS (Uscn, Life Science Inc. China, Lot L130827587) и для eNOS (Cloud-Clone Corp. USA, Uscn, Life Science Inc., Lot L141013209), с помощью фотометра универсального Ф-300 ТП при $\lambda=450$ нм. Содержание iNOS и eNOS в сыворотке крови выражали в нг/мл и пг/мл, соответственно.

Учитывая тот факт, что содержание С-реактивного белка указывает на уровень воспаления и таким образом косвенно определяет риск развития сосудистых «катастроф» мы определяли концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом при использовании диагностического набора С-Reactive Protein (CRP), BioSystems (Испания) по инструкции производителя. Содержание С-реактивного белка выражали в мг/л.

Концентрацию ИЛ-1 β в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа используя тест-системы Thermo Scientific, USA, Lot LD145322. Концентрацию ИЛ-1 β в сыворотке крови выражали в пг/мл.

Концентрацию стабильных продуктов деградации NO (NO²/NO³-) определяли в гомогенате левого желудочка. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди, с последующим фотометрическим определением (при длине волны 520 нм) нитрит-ионов с помощью реакции Грисса [4, 35].

Об активации перекисного окисления липидов в миокарде судили по накоплению в нем диеновых конъюгатов и малонового диальдегида спектрофотометрическим методом. Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывали, учитывая величину молярного коэффициента экстинкции при 233 нм для сопряженных кислот [6, 45]. Количество малонового диальдегида рассчитывали, учитывая молярный коэффициент экстинкции триметинового комплекса [2, 21].

Супероксиддисмутазу (СОД) определяли с использованием набора реактивов для спектрофотометрического определения фермента супероксиддисмутазы. Непрямой спектрофотометрический метод, основанный на использовании реакции супероксидзависимого окисления кверцетина (флавоноид растительного происхождения), протекающей в щелочной среде, в присутствии тетраметилэтилендиаминана (ДМСО). Реакция сопровождается обесцвечиванием рабочего раствора в области пропускания с максимумом при 406 нм. Фермент супероксиддисмутаза перехватывает, образуемые в этих условиях супероксид-радикалы и ингибирует окисление кверцетина. При времени инкубации 20 мин степень ингибирования строго количественно зависит от концентрации СОД. Содержание фермента в биологическом материале рассчитывается с помощью уравнения, полученного на основании калибровочного графика, приведенного в инструкции к набору.

Для определения СОД ткань сердца гомогенизировали в физ. растворе. Затем гомогенат центрифугировали при 15000 обр/мин в течение 20 мин, затем полученный супернатант разводили в 50 раз физ. раствором и далее проводили измерение по методике. Метод определения активности каталазы (КАТ) основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимум поглощения при 410 нм.

Для определения КАТ ткань сердца гомогенизировали в физ. растворе. Затем гомогенат центрифугировали при 15000 обр/мин в течение 20 мин, затем полученный супернатант разводили в 50 раз трисбуфером pH 7,4 и далее проводили измерение по методике.

Расчет проводили по убыли перекиси водорода за 1 минуту на 1 мг белка с учетом всех разведений.

Измерение всех показателей проводили на приборе спектрофлуориметре Солар “СМ2203” отечественного производителя (г.Минск ЗАО “Оптика, авангардные технологии”).

В контрольной группе животных уровень гликозилированного гемоглобина составил 2,6%, а в группе животных, перенесших стресс - 3,2% ($p>0,05$, по сравнению с контролем). Стрептозоцин-индуцированный сахарный диабет и иммобилизационный стресс, воспроизведенный на фоне такого диабета, приводили к сходному повышению содержания гликозилированного гемоглобина (5,4% и 6%), по сравнению с таковым в контроле ($p<0,05$).

Концентрация NO^2/NO^3 в крови крыс групп «стресс», «сахарный диабет», «сахарный диабет+стресс» и «адаптация» достоверно увеличивалась, по сравнению с контрольным значением (табл. 4.18). Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в миокарде после перенесенного стресса, сахарного диабета и при их сочетании также возрастало, на фоне снижения СОД и КАТ (табл. 4.18). В группах «адаптация» и «адаптация+стресс» концентрация ДК и МДА не отличалась от контрольных показателей. При этом наблюдалось активация антиоксидантной активности (табл. 4.18)

Концентрация С-реактивного белка и ИЛ-1 β в сыворотке крови крыс после 6-часового иммобилизационного стресса, сахарного диабета и стресса, моделируемого на фоне сахарного диабета, увеличивалась практически в одинаковой степени, в 2 раза превышая контрольный показатель.

В группе животных, перенесших стресс, содержание eNOS в сыворотке крови снижалось на 78%, а индуцибельной – возрастало в 9 раз. В группе животных «сахарный диабет», содержание eNOS в сыворотке крови снижалось в среднем на 76%, а концентрация индуцибельной NO-синтазы – возрастала в 6 раз (табл. 4.18).

В группе адаптированных к стрессу животных активность iNOS возрастала в 2 раза, при этом значения активности eNOS были сопоставимы с контрольными значениями. В группе «адаптация» и «адаптация+стресс» концентрация С-реактивного белка и ИЛ-1 β не отличалась от показателей группы «контроль», табл. 4.18).

Таблица 4.18. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета и адаптации к стрессу на показатели активности NOS, концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови; NO²/NO³-, продуктов ПОЛ (ДК; МДА) и АОА (СОД; КАТ) в гомогенате миокарда, экспериментальных животных.

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ² /NO ³ -мкМ в миокарде	Концентрация ДК, нМ/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нМ/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкМ/г миокарда	Концентрация С-RV, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=20)	47,2 (41,6;63,3)	2,66 (2,39;2,93)	24,3 (23,0;24,5)	100,44 (76,0;128,1)	77,66 (74,3;93,1)	70,27 (66,2;77,8)	68,12 (37,7;80,9)	0,21 (0,07;0,23)	0
Стресс (n=13)	10,1 (7,3;14,6) p=0,001	18,8 (15,1;32,4) p=0,0004	33,1 (29,9;43,1) p=0,0007	329,29 (94,2;643,1) p=0,0007	278,65 (190,4;281,9) p=0,0001	39,4 (28,9;37,5) p=0,0007	34,9 (32,6;46,8) p=0,034	0,36 (0,24;0,39) p=0,003	19,5 (18,5;23,7) p=0,003
Сахарный диабет (n=13)	12,5 (10,6;14,8) p=0,0003	10,1 (7,2;12,7) p=0,0001	43,1 (39,3;54,9) p=0,004	199,0 (180,3;274,7) p=0,003	111,3 (64,3;258,3) p=0,010	34,6 (29,5;39,4) p=0,001	29,9 (28,9;33,8) p=0,010	0,34 (26,8;30,94) p=0,001	28,9 (26,8;30,9) p=0,0004
Сахарный диабет+стресс (n=8)	13,1 (11,4;15,1) p=0,0005	12,2 (8,1;13,7) p=0,003	35,3 (33,5;40,7) p=0,0007	540,4 (247,3;952,5) p=0,0001	361,5 (224,9;451,5) p=0,003	33,3 (29,5;35,4) p=0,005	28,0 (27,9;34,4) p=0,002	0,40 (0,34;0,41) p=0,003	27,8 (26,3;33,1) p=0,003
Адаптация (n=8)	92,2 (29,1;151,1)	3,5 (3,2;3,7)	29,3 (27,2;30,5)	115,4 (111,9;126,0)	97,45 (83,0;99,6)	90,4 (76,8;94,7)	80,5 (50,5;91,6)	0,05 (0,04;0,06)	0
Адаптация+стресс (n=8)	29,9 (22,4;54,1)	3,48 (3,4;3,5)	23,5 (21,6;24,3)	100,2 (78,8;106,4)	77,9 (73,5;97,7)	77,4 (58,7;99,6)	69,62 (47,4;86,5)	0,20 (0,18;0,22)	1,89 (-2,26;10,19)

Примечание - p<0,05 по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

4.3.4. Влияние стресса, экспериментального сахарного диабета, адаптации к стрессу на экспрессию eNOS и iNOS в препаратах левого желудочка

После фиксации левого желудочка в 10% растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы толщиной 5-7 мкм. Для гистологического исследования использовали следующие методы окраски: гематоксилином и эозином (для обзорной микроскопии), иммуногистохимическую с использованием поликлональных антител к iNOS (1:75) и eNOS (1:150) (Abcam, UK).

В качестве визуализирующей системы использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, UK), включающую комплекс вторичных антител и диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксилин для докрашивания препаратов.

Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили с использованием роботизированной станции по иммуногистохимическому окрашиванию препаратов Bond™ – MAX Processing Module (производства Biosystems Melbourne Pty Ltd, Австралия) в соответствии с протоколами окрашивания и рекомендациями Leica. После автоматизированного окрашивания препараты промывали под проточной водой, обезживали в спирте и просветляли в карбол-ксилоле и ксилоле. После этого срезы заключали в среду «Bio Mount» («Bio Optica» Milano) и накрывали покровным стеклом. Интерпретацию результатов проводили полуколичественным методом оценки интенсивности окрашивания препарата.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов сердца контрольной группы животных изоформа eNOS определялась в цитоплазме кардиомиоцитов и эндотелии коронарных сосудов от умеренной (++) до выраженной (+++) (рис. 4.17, А). Реакция iNOS была слабой (+), преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 4.18, А). В препаратах сердец крыс группы «стресс», eNOS локализовалась в кардиомиоцитах неравномерно, от умеренной (++) до выраженной (+++), в эндотелии сосудов – умеренная (++) (рис. 4.17, Б). После перенесенного стресса в кардиомиоцитах реакция iNOS была умеренной (++) в средней и наружной оболочке коронарных сосудов – слабая (+), а в эндотелии – выраженная (+++) (рис. 4.18, Б). При экспериментальном сахарном диабете реакция eNOS была слабой «+» окрашивание наблюдалось преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 4.17, В). Реакция iNOS была умеренно-выраженная (++) преимущественно в кардиомиоцитах и во всех оболочках сосудов (рис. 4.18, В). В миокарде животных, адаптированных к стрессу, реакция eNOS была слабой (+) преимущественно в кардиомиоцитах (рис. 4.17, Г). Реакция iNOS в группе «адаптация» была от слабой (+) до умеренной (++) – окрашивание отмечалось преимущественно в гладкомышечных клетках коронарных сосудов (рис. 4.18, Г). В группе животных «адаптация+стресс» реакция eNOS была выраженной (+++), окрашивание отмечалось в эндотелии сосудов и в цитоплазме кардиомиоцитов. Реакция iNOS была слабой (+), преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов (данные не показаны).

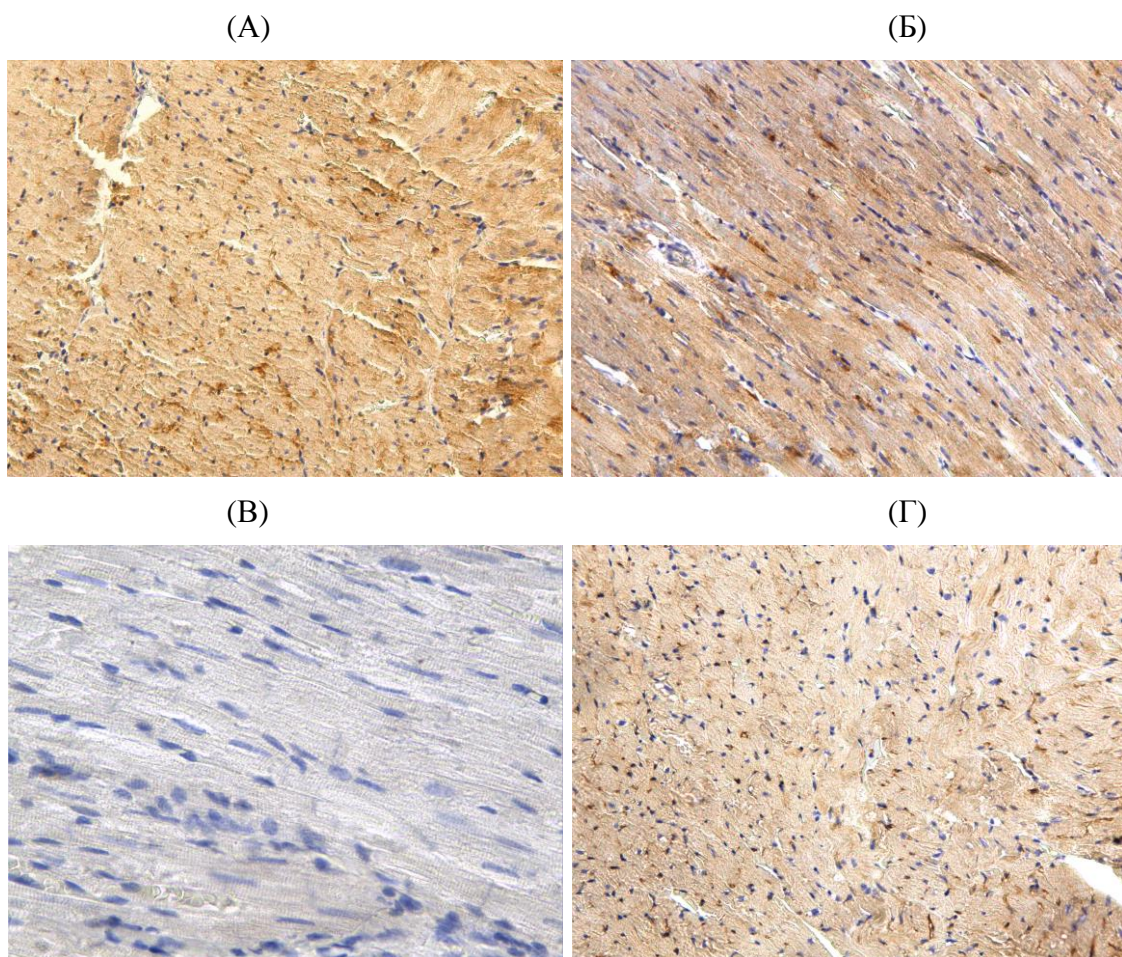


Рисунок 4.17. Экспрессия eNOS в образцах миокарда крыс исследуемых групп: (А) – «Контроль»; (Б) – «Стресс». (В) – «Сахарный диабет»; (Г) – «Адаптация» Окрашка Anti-enos antibody. Увеличение 100(А, Б, Г); Увеличение 200 (В)

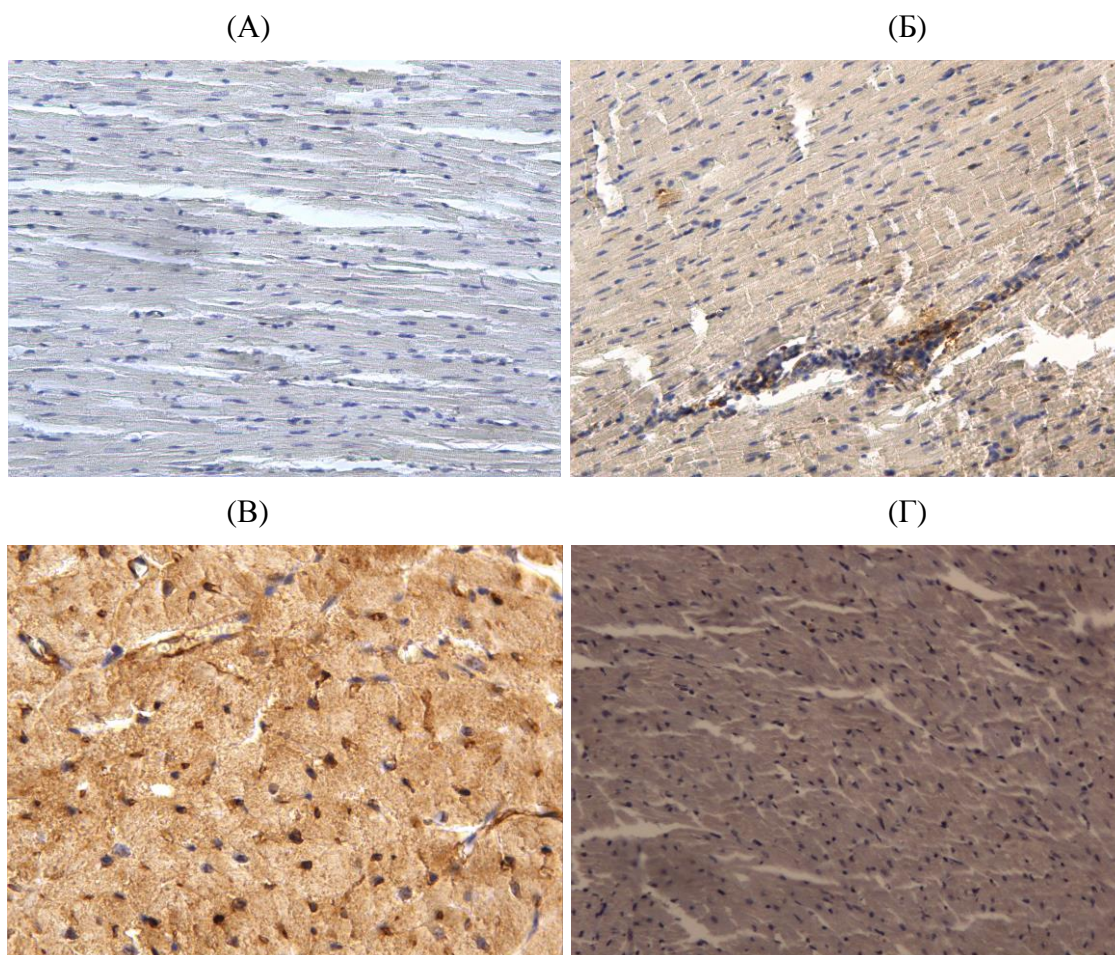


Рисунок 4.18. Экспрессия iNOS в образцах миокарда крыс исследуемых групп: А) – «Контроль»; (Б) – «Стресс». (В) – «Сахарный диабет»; (Г) – «Адаптация». Окраска Anti-iNOS antibody. Увеличение 100 (А, Б, Г); Увеличение 200 (В)

Объяснение полученным данным могут быть представлены следующим способом.

Снижение миогенного тонуса коронарных сосудов и нарушение сократительной функции сердца после 6-часового иммобилизационного стресса в значительной мере также обусловлены гиперпродукцией оксида азота индуцибельной NO-синтазой. В пользу этого вывода свидетельствуют снижение коронарного перфузионного давления и развиваемого внутрижелудочкового давления при перфузии сердец крыс, раствором, содержащим высокоселективный блокатор iNOS, 6-кратное увеличение содержания в миокарде этих крыс уровня транскриптов, кодирующих iNOS, наряду с достоверным повышением содержания в крови стабильных продуктов деградации оксида азота – нитратов/нитритов, продуктов перекисного окисления липидов, 3-кратное увеличение активности фермента iNOS при снижении активности eNOS на 52% (для сравнения в контроле iNOS - $40 \pm 11,0$ eNOS - $106 \pm 9,5$ нмоль/г белка в минуту). Методом иммуноферментного анализа установлено, что в группе животных, перенесших стресс, концентрация эндотелиальной NO-синтазы снижалась на 78%, а индуцибельной – возрастала в 9 раз.

Однако использование блокатора iNOS лишь наполовину восстановило скорость сокращения (+dP/dt) и расслабления (-dP/dt) миокарда после иммобилизационного стресса. Обнаружение двукратного увеличения содержания С-реактивного белка в крови крыс и увеличения концентрации ИЛ-1 β после стресса отражает не только развитие в этих условиях системного воспаления низкой интенсивности, но и объясняет один из механизмов активации iNOS в этих условиях. Известно, что С-реактивный белок способен активировать моноциты [13], которые образуют продукты, повышающие экспрессию

генов iNOS, и участвующие в развитии воспаления. Выявленное нами и другими исследователями [25] системное воспаление низкой интенсивности, развивающееся при продолжительном и выраженном эмоционально-болевым стрессе, объясняет частое возникновение при этом сосудистых «катастроф», важнейшим звеном патогенеза которых является плохо контролируемое воспаление в сосудистой стенке.

Сходные изменения были выявлены и у крыс со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом. В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом уровень глюкозы в крови составил $26,1 \pm 1,7$ ммоль/л, то есть в 5 раз выше, чем у контрольных крыс ($5,7 \pm 1,1$ ммоль/л, $p < 0,05$). В группе крыс «стресс+сахарный диабет» концентрация глюкозы в крови составляла $25,9 \pm 1,5$ ммоль/л и была сопоставима с таковой в группе «сахарный диабет». В группах «сахарный диабет» и «сахарный диабет+стресс» выявлялись глюкозурия и кетонурия. В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом выживаемость составляла 70%. По истечении 14-ти дней после введения стрептозоцина у крыс масса тела снижалась в среднем на 19% и составляла $148 \pm 3,1$ грамм против $183 \pm 6,3$ грамм до начала эксперимента. Гипергликемия, увеличение содержания гликозилированного гемоглобина, глюкозурия, кетонурия, а также снижение массы тела крыс уже через 14 дней после введения им стрептозоцина свидетельствуют об адекватности используемой экспериментальной модели сахарного диабета. Повышение ослабленного миогенного тонуса коронарных сосудов и сниженного развиваемого внутрижелудочкового давления крыс этой группы с помощью высокоселективного блокатора iNOS указывает на важную роль активации этой изоформы NO-синтазы в механизмах указанных нарушений, что согласуется с результатами других исследований [14, 38, 49]. Однако, блокатор iNOS лишь частично, как и после стресса, восстанавливал скорость сокращения ($+dP/dt$) и расслабления ($-dP/dt$) миокарда. Эти данные косвенно указывают на стереотипное нарушение кругооборота ионизированного кальция в кардиомиоцитах животных, перенесших стресс или сахарный диабет, вызванное действием других механизмов, например, высокими концентрациями активных форм кислорода. Эти рассуждения косвенно подтверждаются тем, что в миокарде крыс групп «стресс» и «сахарный диабет» достоверно увеличивалось содержание продуктов перекисного окисления липидов. Важная роль гиперпродукции оксида азота индуцированной NO-синтазой в механизмах снижения тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при сахарном диабете подтверждается результатами, полученными в ходе ПЦР-РВ, которые выявили почти 6-кратное увеличение экспрессии генов, ответственных за синтез iNOS, в миокарде крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Обращает на себя внимание гораздо большее увеличение концентрации нитратов/нитритов в крови крыс группы «сахарный диабет», по сравнению с таковым в группе «стресс». Концентрация продуктов ПОЛ в миокарде была такой же высокой, как и после иммобилизационного стресса. Наблюдалось почти 3-кратное увеличение активности фермента iNOS при неизменной активности eNOS. Иммуноферментный анализ выявил 5-кратное увеличение концентрации iNOS в сыворотке крови животных, при этом концентрация eNOS не отличалась от контрольных показателей. При экспериментальном сахарном диабете реакция eNOS была слабой «+» окрашивание наблюдалось преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов.

Достоверное увеличение концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови и ИЛ-1 β животных с экспериментальным сахарным диабетом также указывает на развитие у них системного воспаления низкой интенсивности. Таким образом, характер нарушения тонуса сосудов сердца и сократительной функции миокарда при продолжительном эмоционально-болевым стрессе и стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете сходны.

При моделировании иммобилизационного стресса на фоне сахарного диабета было установлено, что величины коронарного перфузионного давления и показатели сократительной функции миокарда достоверно не отличались от таковых в контроле. Эти

факты свидетельствуют о некоем «прекондиционирующем» влиянии не скорректированной гипергликемии на фенотипические свойства клеток сосудов сердца и кардиомиоцитов, ярко проявляющемся при последующем иммобилизационном стрессе. При этом обращает на себя внимание то, что сверхэкспрессия генов iNOS в миокарде крыс группы «сахарный диабет+стресс» в 51 раз не сопровождалась столь массивной гиперпродукцией NO, о чем косвенно свидетельствует сходное увеличение концентрации нитратов/нитритов в сыворотке крови крыс, перенесших сахарный диабет, иммобилизационный стресс и их сочетанное воздействие. Более того, иммуноферментный анализ показал 20-кратное увеличение концентрации фермента iNOS при этом концентрация фермента eNOS в сыворотке крови экспериментальных животных была сопоставима с контрольными показателями. Активность iNOS возрастала в 1,2 раза, а eNOS снижалась на 72%. Для обнаруженного нами явления может быть предложено несколько объяснений.

Во-первых, в условиях иммобилизационного стресса, моделируемого на фоне сахарного диабета, могло развиваться т.н. «разобщение» субъединиц вновь образовавшейся индуцированной NO-синтазы, и такой фермент, наряду с NO, мог производить супероксидный радикал, пероксинитрит, нитрозотиолы или другие соединения с последующим уменьшением биодоступности NO [28]. «Разобщение» индуцированной NO-синтазы в сердцах крыс с экспериментальным сахарным диабетом было выявлено ранее при моделировании у них ишемии миокарда с последующей реперфузией [46]. «Разобщение» iNOS могло быть вызвано высокими концентрациями активных форм кислорода и азота, о значительном повышении образования которых косвенно свидетельствует достоверно более высокое содержание ДК и МДА в миокарде крыс группы «сахарный диабет+стресс», чем в миокарде крыс группы «стресс» или группы «сахарный диабет». Известно, что различные виды активных форм кислорода или азота специфическим образом подавляют образование NO индуцированной NO-синтазой, а также стимулируют образование этим ферментом супероксидного радикала [41, 51]. В пользу правильности наших рассуждений о «разобщении» iNOS и образовании в этих условиях супероксидного радикала свидетельствует и то, что селективный блокатор iNOS, несмотря на стереотипный характер увеличения концентрации $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ в крови крыс всех опытных групп, приводил к более существенному повышению коронарного перфузионного давления в сердцах крыс группы «сахарный диабет+стресс». Ранее А. Cериелло и соавт. продемонстрировали, что восстановленный глутатион, являющийся «скавенджером» активных форм кислорода и редокс-активным веществом, предупреждает повышение тонуса коронарных сосудов при гипергликемии [11], а Zhu M. и соавт. при инкубации культуры эндотелиоцитов, полученных из пупочной вены, в среде с высоким содержанием в ней глюкозы, доказали факт увеличения образования в этих клетках супероксидного радикала [59].

Во-вторых, в условиях экспериментального сахарного диабета могло измениться функционирование системы NO-синтаза/аргиназа/диметиларгинин диметиламиногидролаза с последующим уменьшением образования оксида азота. Известно, что стимуляция индуцированной NO-синтазы посредством ряда внутриклеточных сигнальных путей способна приводить к активации аргиназы эндотелиоцитов [12] с последующим уменьшением доступности основного субстрата NO-синтазной реакции L-аргинина. Установлено также, что добавление высоких концентраций глюкозы в питательную среду в течение 5 дней сопровождается снижением образования диметиларгинин диметиламиногидролазы-2, фермента, разрушающего эндогенный ингибитор NO-синтазы асимметричный диметиларгинин, в культуре эндотелиоцитов [32].

В-третьих, в условиях продолжительной гипергликемии в эндотелиоцитах возрастает образование вазоконстрикторов, в частности, эндотелина-1 [25] и изменяются механизмы регуляции гомеостаза ионизированного кальция в сосудистых гладкомышечных клетках [17, 58]. По-видимому, фенотипические свойства клеток

кровеносных сосудов изменялись в условиях гиперпродукции NO в большей степени, чем свойства кардиомиоцитов: в то время как селективный блокатор индуцированной NO-синтазы S-MT приводил к существенному увеличению коронарного перфузионного давления в изолированных сердцах крыс, перенесших стресс на фоне имеющегося у них сахарного диабета, сократительная функция миокарда и первая производная (dP/dt) при этом практически не изменялись.

Таким образом, установлено, что ослабление миогенного тонуса коронарных сосудов и снижение сократительной функции миокарда при иммобилизационном стрессе, развивающиеся на фоне стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета, во многом обусловлены стимуляцией индуцированной NO-синтазы, которая в этих условиях может продуцировать не только оксид азота, но и активные формы кислорода. Полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении фенотипических характеристик клеток сердца и его сосудов при продолжительной гипергликемии, что может объяснять специфический характер сосудистых реакций при последующем эмоционально-болевым стрессе.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью предупредила постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов и снижение сократительной функции миокарда. В изолированных сердцах крыс, адаптированных к стрессу, образуется iNOS. Этот факт подтверждается как экспрессией гена, ответственного за синтез iNOS, в гомогенате миокарда крыс, а также обнаружением этого фермента в гладкомышечных клетках коронарных сосудов при иммуногистохимическом исследовании. Результаты перфузии изолированного сердца крыс, адаптированных к стрессу при использовании селективного ингибитора iNOS S-метилизотиомочевина также подтверждают этот факт.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям так же, как иммобилизация и экспериментальный сахарный диабет, сопровождается усилением продукции NO, увеличением экспрессии генов, ответственных за синтез iNOS, но, в отличие от стресса и сахарного диабета, умеренным накоплением фермента, неизменной системной активностью фермента eNOS и отсутствием системного воспаления низкой интенсивности (что подтверждалось неизменной концентрацией С-реактивного белка и отсутствием ИЛ-1 β в сыворотке крови адаптированных к стрессу животных).

Становится очевидным, что существуют оптимальные концентрации NO, обладающие кардио- и вазопротекторным эффектом. Вероятно, влияние активации iNOS на функциональное состояние миокарда и сосудов во многом зависит от количества NO, длительности его образования, а также от локализации и условий, в которых он будет синтезирован.

4.4. Влияние системной блокады iNOS на тонус коронарных сосудов крыс при адаптации к стрессу

Животные были подразделены на группы: 1-ая – «контроль» (n=20); 2-ая - группа животных перенесших 6-ти часовой иммобилизационный стресс – «стресс» (n=13); 3-я – группа животных адаптированных короткими стрессорными воздействиями – «адаптация» (n=8); 4-ая – группа животных перенесших стресс, на фоне предварительной адаптации - «адаптация+ стресс» (n=8); 5-ая – группа животных, которым в процессе адаптации внутрибрюшинно вводили селективный блокатор iNOS – S-метилизотиомочевину (S-MT, 3 мг/кг массы тела за 30 мин. до начала процедуры) «адаптация+ в/б S-MT» (n=8); 6-ая – группа животных перенесших 6-ти часовой иммобилизационный стресс на фоне предварительной адаптации с внутрибрюшинным введением S-MT - «адаптация+стресс в/б S-MT» (n=8).

Так внутрибрюшинное введение S-MT контрольным животным и крысам в течение адаптации не приводило к изменению тонуса коронарных сосудов и сократительной

функции миокарда (табл. 4.19, 4.20). В группе животных «адаптация+стресс в/б S-MT» наблюдалось снижение тонуса коронарных сосудов при ОСКП от 10 до 15 мл/мин. на 15 и 25% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 4.19). Снижение сопротивления сосудов сердца в группе животных, перенесших стресс, на фоне предварительной адаптации и внутрибрюшинного введения S-MT, сопровождалось снижением как развиваемого внутрижелудочкового давления при коронарном перфузионном давлении 10 мл/мин. на 28%, 15 мл/мин. на 41% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой животных, табл. 4.20), так и снижением первой производной при коронарном перфузионном давлении 10-15 мл/мин. ($+dP/dt$ в среднем на 17 и 23% соответственно, $-dP/dt$ на 23 и 25% соответственно, $p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 4.21). Что свидетельствовало о снижении тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у животных в группе «адаптация+стресс в/б S-MT».

Артериальное давление (АД) у крыс определяли неинвазивным методом с использованием системы NIBP (non-invasive blood pressure) фирмы Panlab. Крыс помещали в прозрачный пенал и закрепляли в автоматическом нагревателе ($t = 29^{\circ}\text{C}$), подсоединяли датчик-манжету к хвосту, который располагался в проекции хвостовой артерии. После 20 минут проводили измерения. Для получения достоверных результатов животных предварительно адаптировали к нахождению в пеналах в течение 2-х недель по 15-20 минут ежедневно. Затем измеряли частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое, а также среднее артериальное давление (ЧСС, САД, ДАД и СрАД, соответственно).

В группах «адаптация» и «адаптация+стресс» системное артериальное давление не отличалось от контрольных показателей. Внутрибрюшинное введение S-MT в течение всего периода адаптации способствовало повышению среднего артериального давления (САД) на 11% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 4.22). В группе животных «адаптация+стресс+в/б S-MT» наблюдалось снижение САД на 13% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем), что было выражено в той же степени, что и при стрессе.

Таблица 4.19. Влияние системной блокады индуцибельной NO-синтазы на изменение КИД у крыс

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль (n=20)	Медиана, %	38,5	52,0	66,0	125,0
	Размах (Min-Max), %	33,0-54,0	46,0-66,0	52,0-127,0	80,0-170,0
	95% ДИ для медианы, %	36,0-41,0	47,0-56,0	57,0-74,0	114,0-136,0
	25-75 процентиль, %	35,0;44,0	48,0;61,0	60,0;80,0	110,0;134,0
Стресс (n=13)	Медиана, %	33,0	46,0	59,0	92,0
		p1=0,0002	p1=0,0007	p1=0,001	p1=0,002
	Размах (Min-Max), %	27,0-38,0	37,0-58,0	49,0-71,0	80,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	31,0-34,0	42,0-49,0	55,0-62,0	87,0-96,0
Адаптация (n=8)	25-75 процентиль, %	31,0;35,0	44,0;49,0	55,0;65,0	89,0;98,0
	Медиана, %	37,0	50,0	68,0	120,0
	Размах (Min-Max), %	30,0-40,0	39,0-56,0	44,0-77,0	100,0-133,0
	95% ДИ для медианы, %	35,0-39,0	47,0-53,0	63,0-73,0	114,0-126,0
Адаптация+стресс (n=8)	25-75 процентиль, %	35,0;37,0	50,0;53,0	60,0;70,0	115,0;125,0
	Медиана, %	35,0	62,0	80,0	118,0
	Размах (Min-Max), %	25,0-41,0	40,0-92,0	55,0-100,0	95,0-139,0
	95% ДИ для медианы, %	31,0-39,0	48,0-75,0	66,0-93,0	106,0-129,0
Адаптация в/б S-MT (n=8)	25-75 процентиль, %	32,0;37,0	50,0;69,0	72,0;85,0	110,0;126,0
	Медиана, %	41,0	55,0	68,0	121,0
	Размах (Min-Max), %	32,0-46,0	39,0-57,0	56,0-87,0	87,0-140,0
	95% ДИ для медианы, %	38,0-44,0	49,0-60,0	59,0-76,0	106,0-134,0
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=8)	25-75 процентиль, %	40,0;42,0	49,0;57,0	60,0;73,0	109;130,0
	Медиана, %	42,0	52,0	64,0	97,0
				p1=0,004	p1=0,002
	Размах (Min-Max), %	34,0-50,0	42,0-64,0	52,0-94,0	76,0-143,0
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=8)	95% ДИ для медианы, %	37,0-47,0	45,0-59,0	52,0-76,0	77,0-117,0
	25-75 процентиль, %	37,0;43,0	48,0;58,0	62,0;70,0	87,0;110,0

Примечание: p1<0,05 - по сравнению с величинами, полученными при перфузии изолированного сердца контрольной группы; n-количество животных в группе.

Таблица 4.20. Влияние системной блокады индуцибельной NO-синтазы на изменение **PВД** у крыс

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6	8	10	15
Контроль (n=20)	Медиана, %	35,0	57,0	70,0	90,0
	Размах (Min-Max), %	28,0-53,0	40,0-89,0	40,0-104,0	50,0-155,0
	95% ДИ для медианы, %	32,0;38,0	51,0;62,0	62,0;78,0	79,0;101,0
	25-75 процентиль, %	32,0;41,0	37,0;63,0	60,0;81,0	83,0;102,0
Стресс (n=13)	Медиана, %	22,0	36,0	45,0	60,0
		p1=0,004	p1=0,002	p1=0,0007	p1=0,0001
	Размах (Min-Max), %	15,0-36,0	20,0-43,0	30,0-60,0	30,0-70,0
	95% ДИ для медианы, %	18,0-26,0	32,0-40,0	40,0-50,0	53,0-67,0
Адаптация (n=8)	25-75 процентиль, %	20,0;26,0	30,0;38,0	40,0;50,0	50,0;70,0
	Медиана, %	36,0	45,0	64,0	85,0
	Размах (Min-Max), %	26,0-45,0	40,0-67,0	50,0-82,0	70,0-110,0
	95% ДИ для медианы, %	33,0-39,0	39,0-51,0	57,0-71,0	77,0-93,0
Адаптация+стресс (n=8)	25-75 процентиль, %	30,0;40,0	40,0;56,0	55,0;70,0	80,0;100
	Медиана, %	29,0	49,0	65,0	90,0
	Размах (Min-Max), %	25,0-50,0	40,0-60,0	55,0-90,0	88,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	21,0-36,0	43,0-55,0	55,0-75,0	87,0-93,0
Адаптация в/б S-MT (n=8)	25-75 процентиль, %	26,0;36,0	40,0;55,0	59,0;73,0	90,0;90,0
	Медиана, %	50,0	66,0	74,0	84,0
	Размах (Min-Max), %	25,0-59,0	31,0-80,0	40,0-100,0	55,0-120,0
	95% ДИ для медианы, %	38,0-62,0	53,0-79,0	55,0-92,0	62,0-105,0
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=8)	25-75 процентиль, %	27,0;52,0	54,0;70,0	60,0;85,0	68,0;114,0
	Медиана, %	32,0	46,0	60,0	70,0
				p1=0,0002	p1=0,02
	Размах (Min-Max), %	25,0-41,0	30,0-50,0	40,0-94,0	50,0-110,0
	95% ДИ для медианы, %	23,0-38,0	38,0-53,0	44,0-76,0	50,0-89,0
	25-75 процентиль, %	30,0;38,0	43,0;49,0	50,0;66,0	60,0;85,0

Примечание: p1<0,05 - по сравнению с величинами, полученными при перфузии изолированного сердца контрольной группы; n - количество животных в группе.

Таблица 4.21. Влияние системной блокады индуцибельной NO-синтазы на изменение первой производной ($+dP/dt$, $-dP/dt$) в группе животных перенесших стресс на фоне предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям

Группа	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин				
		6	8	10	15	
Контроль (n=20)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	1320	1932	2156	2852
		Размах (Min-Max), %	1202-1562	1655-2518	1220-2574	1552-3883
		95% ДИ для медианы, %	1267-1372	1846-2017	2003-2308	2604-3099
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	1261;1402	1893;1961	2016;2346	2558;2892
		Медиана, %	-861	-1332	-1532	-1850
		Размах (Min-Max), %	-1088;-617	-1657;-913	-1933;-1007	-2210;-1281
Стресс (n=13)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	95% ДИ для медианы, %	-922;-799	-1467;-1196	-1658;-1406	-1967;-1732
		25-75 процентиль, %	-948;-767	-1413;-1105	-1692;-1348	-1998;-1798
		Медиана, %	812	966	1250	1576
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Размах (Min-Max), %	p1=0,004 422-1040	p1=0,0002 715-1202	p1=0,0007 829-1757	p1=0,001 975-2193
		95% ДИ для медианы, %	692-931	866-1066	1075-1425	1874-2217
		25-75 процентиль, %	674;885	861;1088	985;1398	1205;2040
Адаптация (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	-548	-731	-954	-1145
		Размах (Min-Max), %	p2=0,0002 -780;-325	p2=0,003 -910;-522	p2=0,001 -1251;-715	p2=0,002 -1657;-740
		95% ДИ для медианы, %	-636;-459	-816;-645	-1079;-829	-1321;-969
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	-640;-479	-835;-593	-1108;-754	-1336;-959
		Медиана, %	1121	1413	1673	2047
		Размах (Min-Max), %	910-1885	1337-1982	1430-2356	1761-3720
	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	95% ДИ для медианы, %	926-1315	1226-1599	1470-1875	1708-2385
		25-75 процентиль, %	1056;1381	1202;1673	1497;1852	1929;2508
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	-775	-980	-1332	-1576
		Размах (Min-Max), %	-1257;-601	-1608;-812	-1949;-1121	-2307;-1212
		95% ДИ для медианы, %	-903;-646	-1142;-817	-1492;-1171	-1781;-1370
		25-75 процентиль, %	-975;-699	-1315;-893	-1500;-1170	-1795;-1399

Продолжение таблицы 4.21

Адаптация+стресс (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	920	1349	1629	2325
		Размах (Min-Max), %	829-1446	1072-1632	1153-1863	2031-2401
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	95% ДИ для медианы, %	740-1100	1173-1524	1453-1803	2185-2464
		25-75 процентиль, %	893;1080	1105;1436	1494;1702	2177;2339
		Медиана, %	-706	-1145	-1268	-1614
Адаптация в/б S-MT (n=8)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Размах (Min-Max), %	-946;-510	-1288;-812	-1410;-845	-1990;-877
		95% ДИ для медианы, %	-809;-602	-1302;-988	-1421;-1115	-1938;-1290
		25-75 процентиль, %	-743;-681	-1212;-904	-1351;-1145	-1949;-1316
		Медиана, %	1454	1908	2104	2274
		Размах (Min-Max), %	812-1675	926-2161	1105-3506	1413-3866
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	95% ДИ для медианы, %	1133-1774	1507-2309	1400-2807	1292-3255
		25-75 процентиль, %	874;1633	1239;2088	1255;2652	1585;3585
		Медиана, %	-871	-1140	-1226	-1495
		Размах (Min-Max), %	-1056;-638	-1348;-796	-2161;-910	-2617;-1090
		95% ДИ для медианы, %	-999;-742	-1277;-1002	-1548;-907	-2027;-962
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=7)	+dP/dtmax (мм рт.ст./с)	25-75 процентиль, %	-962;-692	-1206;-1066	-1492;-1104	-2047;-1218
		Медиана, %	1137	1397	1852	1998
		Размах (Min-Max), %	812-1576	991-1625	p1=0,002 1251-2128	p1=0,0001 1590-2745
		95% ДИ для медианы, %	818-1455	1106-1687	1421-2282	1502-2493
		25-75 процентиль, %	1088;1251	1383;1592	1543;2096	1996;2323
	-dP/dtmax (мм рт.ст./с)	Медиана, %	-796	-1056	-1283	-1332
		Размах (Min-Max), %	-975;-601	-1186;-682	p2=0,003 -1592;-892	p2=0,004 -1945;-1007
		95% ДИ для медианы, %	-950;-641	-1288;-823	-1585;-980	-1722;-941
		25-75 процентиль, %	-829;-764	-1153;-958	-1365;-1121	-1395;-1321

Примечание: p1<0,05 - по сравнению с величинами +dP/dtmax контрольной группы животных; p2<0,05 - по сравнению с величинами -dP/dtmax контрольной группы животных; n-количество животных в группе.

Таблица 4.22. Влияние системной блокады индуцибельной NO-синтазы на изменение частоты сердечных сокращений (ЧСС); систолического давления (СД); диастолического давления (ДД); среднего артериального давления (САД) в группе животных перенесших стресс на фоне предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям

Группа	Показатель	ЧСС (уд/мин)	СД (мм рт.ст)	ДД (мм рт.ст)	САД (мм рт.ст)
Контроль (n=8)	Медиана, %	302,0	126,0	109,0	114,0
	Размах (Min-Max), %	279,0-325,0	116,0-135,0	102,0-118,0	106,0-123,0
	95% ДИ для медианы, %	288,0-314,0	121,0-130,0	103,0-113,0	109,0-117,0
	25-75 процентиль, %	293,0;317,0	124,0;128,0	107,0;112,0	112,0;118,0
Стресс (n=8)	Медиана, %	450,0	116,0	89,0	99,0
		p1=0,005	p1=0,0001	p1=0,0002	p1=0,003
	Размах (Min-Max), %	322,0-469,0	107,0-136,0	80,0-97,0	91,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	394,0-505,0	107,0-125,0	84,0-94,0	96,0-102,0
Адаптация (n=8)	25-75 процентиль, %	371,0;464,0	110,0;121,0	87,0;91,0	96,0;100,0
	Медиана, %	360,0	126,0	111,0	117,0
	Размах (Min-Max), %	324,0-420,0	120,0-131,0	106,0-118,0	112,0-121,0
	95% ДИ для медианы, %	322,0-397,0	121,0-130,0	105,0-115,0	112,0-120,0
Адаптация+стресс (n=8)	25-75 процентиль, %	335,0;385,0	122,0;127,0	108,0;117,0	113,0;120,0
	Медиана, %	368,0	125,0	113,0	115,0
	Размах (Min-Max), %	325,0-410,0	119,0-130,0	105,0-119,0	113,0-121,0
	95% ДИ для медианы, %	339,0-396,0	120,0-129,0	108,0-117,0	112,0-117,0
Адаптация в/б S-MT (n=6)	25-75 процентиль, %	339,0;388,0	120,0;127,0	109,0;116,0	114,0;119,0
	Медиана, %	363,0	139,0	123,0	127,0
		p1=0,002	p1=0,002	p1=0,002	p1=0,002
	Размах (Min-Max), %	349,0-398,0	132,0-150,0	115,0-134,0	120,0-139,0
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=7)	95% ДИ для медианы, %	342,0-382,0	132,0-144,0	116,0-129,0	120,0-133,0
	25-75 процентиль, %	354,0;381,0	138,0;141,0	120,0;127,0	126,0;131,0
	Медиана, %	401,0	113,0	100,0	99,0
		p1=0,05	p1=0,003	p1=0,0001	p1=0,002
	Размах (Min-Max), %	322,0-463,0	107,0-136,0	89,0-120,0	91,0-100,0
	95% ДИ для медианы, %	344,0-457,0	104,0-121,0	90,0-109,0	95,0-102,0
	25-75 процентиль, %	336,0;454,0	110,0;119,0	93,0;103,0	96,0;100,0

Примечание – p1<0,05 - по сравнению с величинами группы «Контроль»; n-количество животных в группе.

В группах «адаптация+в/б S-MT» и «адаптация+стресс+в/б S-MT» выявлено снижение концентрации $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ на фоне увеличения продуктов перекисного окисления липидов (ДК и МДА) и снижении антиоксидантной активности (СОД и КАТ) в миокарде опытных групп животных (табл. 4.23).

Системная блокада iNOS в течение адаптации приводила к развитию в этих условиях системного воспаления низкой интенсивности. Этот факт подтверждается 2-х кратным увеличением концентрации С-реактивного белка и ИЛ-1 β в сыворотке крови (табл. 4.23).

При ИФА методе обнаружено снижение концентрации eNOS как в группе «адаптация+в/б S-MT» так и в группе «адаптация+стресс+в/б S-MT», при этом концентрация iNOS была выражена в большей степени, чем в контроле лишь в группе «адаптация+стресс+в/б S-MT» (табл. 4.23).

При иммуногистохимическом исследовании установлено, что системная блокада iNOS при адаптации к стрессу приводила к локализации eNOS лишь в кардиомиоцитах, от слабой (+), до умеренной (++) (рис. 4.19, А). Экспрессия же iNOS была слабой и обнаружена в только кардиомиоцитах (рис. 4.19, Б).

(А)

(Б)

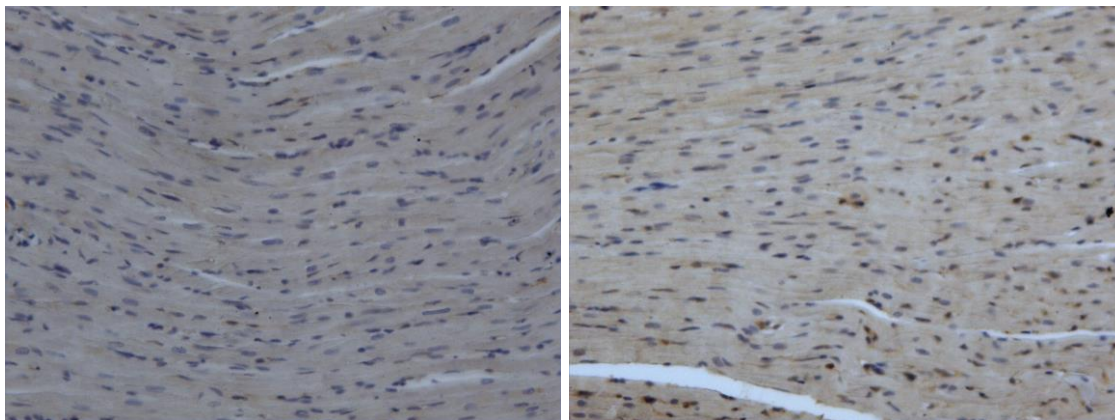


Рисунок 4.19. Экспрессия eNOS (А) и iNOS (Б) в образцах миокарда крыс группы «адаптация+в/б S-MT». Окраска Anti-iNOS и Anti-eNOS antibody. Увеличение 100

Таблица 4.23. Влияние системной блокады индуцибельной NO-синтазы на изменение концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови; NO²/NO³-, продуктов ПОЛ (ДК; МДА) и АOA (СОД; КАТ) в гомогенате миокарда, экспериментальных животных.

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ² /NO ³ - мкм в миокарде	Концентрация ДК, нм/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нм/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкм/г миокарда	Концентрация С-RB, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=20)	47,20 (41,6;63,3)	2,66 (2,39;2,93)	24,30 (23,0;24,5)	100,44 (76,0;128,1)	77,66 (74,3;93,1)	70,27 (66,2;77,8)	68,12 (37,7;80,9)	0,21 (0,07;0,23)	0
Стресс (n=13)	10,10 (7,3;14,6) p=0,003	18,80 (15,1;32,4) p=0,0004	33,10 (29,9;43,1) p=0,0007	329,29 (94,2;643,1) p=0,0007	278,65 (190,4;281,9) p=0,0001	39,40 (28,9;37,5) p=0,0007	34,9 (32,6;46,8) p=0,034	0,36 (0,24;0,39) p=0,003	19,50 (18,5;23,7) p=0,003
Адаптация (n=8)	92,20 (29,1;151,1) p=0,0001	3,50 (3,2;3,7)	29,30 (27,2;30,5)	115,40 (111,9;126,0)	97,45 (83,0;99,6)	90,40 (76,8;94,7)	80,5 (50,5;91,6)	0,05 (0,04;0,06)	0
Адаптация+стресс (n=8)	29,90 (22,4;54,1)	3,48 (3,4;3,5)	23,50 (21,6;24,3)	100,20 (78,8;106,4)	77,90 (73,5;97,7)	77,40 (58,7;99,6)	69,62 (47,4;86,5)	0,20 (0,18;0,22)	1,89 (-2,26;10,19)
Адаптация в/б S-MT (n=8)	11,80 (9,7;13,9) p=0,0024	2,79 (2,5;3,4)	9,31 (9,3;10,5) p=0,0003	111,70 (91,2;126,3)	235,10 (169,9;257,6) p=0,0007	35,60 (19,1;50,6) p=0,004	36,90 (27,7;38,2) p=0,003	0,64 (0,43;0,79) p=0,001	21,60 (15,9;24,2) p=0,010
Адаптация+стресс в/б S-MT (n=8)	11,80 (10,6;17,4) p=0,001	9,260 (6,4;9,7) p=0,0053	9,30 (8,6;9,3) p=0,0003	145,30 (130,5;154,1) p=0,010	242,20 (221,2;252,6) p=0,00077	37,80 (32,6;39,4) p=0,0007	32,80 (28,1;34,9) p=0,0012	0,68 (0,55;0,75) p=0,010	30,90 (12,3;38,21) p=0,0147

Примечание - p<0,05 - по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

Гипотония коронарных сосудов, наблюдаемая в группе «адаптация+стресс+в/б S-MT», вероятно, обусловлена активными формами кислорода, что косвенно подтверждается увеличением ДК и МДА в наших исследованиях, а также снижением антиоксидантной защиты (СОД и КАТ) клеток. Исследования на кровеносных сосудах *in situ* и *in vitro* показывают, что активные формы кислорода (АФК) могут вызывать как вазодилатацию, так и вазоконстрикцию. АФК могут модулировать тонус гладкомышечных клеток сосудов, воздействуя непосредственно на клетки гладкой мускулатуры, а также косвенно, посредством изменения биологической активности вазоактивных медиаторов. Отдельные кислородные радикалы могут иметь разные (иногда противоположные) сосудистые эффекты. Супероксид анион инактивирует эндотелий релаксирующий фактор и адренергический нейротрансмиттер норэпинефрин. Перекись водорода и гидроксильный радикал вызывают вазодилатацию, действуя непосредственно на гладкие мышцы сосудов, а также стимулируя синтез и высвобождение релаксирующего фактора. При острой артериальной гипертензии или экспериментальной черепно-мозговой травме АФК являются важными медиаторами повреждения сосудов. Активация нейтрофилами активных форм кислорода может быть причиной вазодилатации и повышенной проницаемости капиллярной мембраны во время острого воспалительного процесса [47].

Выявленные факты снижения развиваемого внутрижелудочкового давления и уменьшения скорости сокращения и расслабления миокарда изолированных сердец крыс группы «адаптация+стресс+в/б S-MT» свидетельствуют о достаточно стойких последствиях системной блокады iNOS. Снижение показателей dLVPdt max и dLVPdt min, характеризующих скорость сокращения и расслабления миокарда левого желудочка, соответственно, в изолированных сердцах крыс, при адаптации животных перенесших стресс на фоне системной блокады iNOS указывает на наличие признаков как систолической, так и диастолической дисфункции миокарда. Диастолическая дисфункция миокарда опасна, так как потенциально способна привести к развитию диастолической сердечной недостаточности (т.н. сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса), нарушению кровоснабжения субэндокардиальных слоев миокарда и прогрессированию ремоделирования миокарда [30]. Доказано, что даже при отсутствии признаков сердечной недостаточности диастолическая дисфункция ассоциируется с увеличением смертности [37].

Развитие диастолической дисфункции миокарда левого желудочка может быть обусловлено двумя взаимосвязанными причинами: во-первых, увеличением жесткости миокарда левого желудочка, и, во-вторых, нарушением обратного захвата ионов кальция саркоплазматическим ретикулом кардиомиоцитов. Повышение жесткости миокарда левого желудочка обусловлено активацией фибробластов в условиях окислительного стресса, а также дисбалансом цитокинов и факторов роста. Одной из причин как систолической, так и диастолической дисфункции миокарда левого желудочка может быть нарушение гомеостаза ионов кальция в кардиомиоцитах вследствие количественных и/или качественных изменений кальциевых каналов кардиомиоцитов [53].

Наши исследования продемонстрировали, что адаптация к стрессу сопровождается увеличением активности и экспрессии генов eNOS и iNOS. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, которые на изолированных эндотелиоцитах аорты крыс продемонстрировали увеличение экспрессии мРНК iNOS и eNOS при хронических упражнениях [16]. Кроме того, нами показано, что адаптация к стрессу сопровождается увеличением концентрации $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ в миокарде, увеличением антиоксидантной активности и отсутствием воспаления низкой интенсивности в сосудистой стенке. Этот факт навел нас на мысль о том, что некоторая часть NO, продуцируемого как эндотелиальной (eNOS), так и индуцибельной NO-синтазами, по-видимому, связывается с супероксид-радикалом, тем самым ограничивая активность свободнорадикального окисления. Подобное явление получило название уменьшение

биодоступности NO, и при адаптации короткими стрессорными воздействиями оно продемонстрировано впервые. Таким образом, образование индуцибельной NO-синтазы необходимо для того, чтобы поддержать на должном уровне продукцию вазоактивного NO, обеспечить который единственная эндотелиальная NO-синтаза при адаптации к стрессу уже не способна.

Системная блокада iNOS, в течение адаптации к стрессу, приводила к снижению концентрации $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ и активности eNOS, а также усиленному образованию продуктов перекисного окисления липидов (ДК и МДА), на фоне снижения антиоксидантной активности (СОД, КАТ), и развитию в этих условиях воспаления низкой интенсивности в сосудистой стенке. Отсутствие iNOS в процессе адаптации к стрессу приводит к срыву адаптационных механизмов (схема 4.2), что еще раз подтверждает наше предположение об использовании монооксида азота в клетке в качестве молекулы-ловушки супероксидрадикала.



Схема 4.2. Механизм, приводящий к срыву адаптационных механизмов

ЛИТЕРАТУРА

1. Амирянц, В.Ю. Особенности адаптации к условиям гипоксии на низкогорном курорте больных ИБС после аортокоронарного шунтирования / В.Ю. Амирянц // Терапевтический архив. – 1996. – Т. 68, №9. – С. 52–54.
2. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, В.А. Кожемякин // Лабораторное дело. – 1988. – Т. 11. – С. 41 – 43.
3. Ванин, А.Ф., Усиление синтеза оксида азота в стенке аорты при экспериментальном инфаркте миокарда. / А.Ф. Ванин, Е.Б. Манухина, А.В. Лапшин, Ф.З. Меерсон // Бюл. exper. биол. – 1993. – Ч. 116(8). – С. 142-144.
4. Веремей, И.С., Солодков А.П. Восстановление NO₂-/NO₃- цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / Веремей, И.С., Солодков А.П. // Сборн. научных трудов ВГМУ. Витебск. – 1999. – С.28-34
5. Виноградов, Н.А. Антимикробные свойства окиси азота и регуляция ее биосинтеза в макроорганизме// Антибиотики и химиотерапия –1998 – №43; 2 – С.24-29.
6. Гаврилов, В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1988. – Т. 2. – С. 60–64.
7. Лямина, Н.П. Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции / Н.П. Лямина, В.Н. Сенчихин., Д.А. Покидышев, Е.Б.Манухина // Кардиология. – 2001. – №9. – С. 17–21.
8. Манухина, Е.Б. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия: механизмы и пути коррекции / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, В.И. Бувальцев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2003. – №4. – С. 26-30.
9. Оценка потенциальных референсных генов для нормализации данных ПЦР-РВ в экспериментах с клетками линии HeLa / Н.А. Крайнова и др. // Биотехнология. – 2013. – Т. 1. – С. 42–50.
10. Сидоренко, Г. И. Творчество и медицина: поиск неявных решений. / Г. И. Сидоренко // Мн. - 2002.
11. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat // A. Ceriello [et al.] // Diabetes. – 2002. – Vol.51. – P. 1076-1082.
12. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats / J.H. Kim [et al.] // J Appl Physiol. – 2009. – Vol. 107, № 4. P. 1249–1257.
13. Ballou, S.P. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein / Ballou, S.P. Lozanski G. // Cytokine. – 1992. – Vol. 4. – P. 361–368.
14. Bardell, A.L. Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats / A.L. Bardell, K.M. MacLeod // J Pharmacol Exp Ther. – 2001. – Vol. 296, №2. – P. 252–259.
15. Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research / R. Bolli // J Mol Cell Cardiol. – 2001. – Vol. 33, №11. – P. 1897-918.
16. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta / A.-L. Yang [et al.] // J Biomed Sci. – 2002. – Vol.9. – P. 149–155.
17. Descorbeth, M. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11α proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells / M. Descorbeth, M.B. Anand-Srivastava // Free Radic Biol Med. – 2010. – Vol. 49, № 9. – P. 1395-1405.

18. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat / Y. Taritoto [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2000. – Vol. 76, №(2-3). – P. 135-145.
19. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats / G. Asemu [et al.] // *Physiol. Res.* – 2000. – Vol. 49, №5. – P. 597-606.; Meerson, F.Z. *Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation.* – Moscow: Hypoxia Medical LTD – 1994.
20. Enhancement of endothelium-dependent relaxation in the aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats at developmental stages of hypertension / T. Onda [et al.] // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* – 1994. – Vol. 21. – P. 857-863.
21. Esterbauer, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, K.H. Cheeseman // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 186. – P. 407-21.
22. Gewaltig, M. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential / M. Gewaltig, G.Kojda // *Cardiovasc Res.* – 2002. – Vol. 55, №2. – P. 250-60.
23. Hypoxia-induced expression of HIF-1 α and its target genes in umbilical venous endothelial cells of Tibetans and immigrant Han / W. Gao [et al.] // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 141, №1. – P. 93-100.
24. Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension? / T.V. Serebrovskaya [et al.] // *Exp Biol Med.* – 2008. – Vol. 233. – P. 627–650.
25. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model / N. Abu-Saleh [et al.] // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 91, №13-14. – P. 669-675.
26. Ischemic and non-ischemic preconditioning: Endothelium-focused translation into clinical practice / A. Jabs [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2010. – V.45. – P. 185-191.
27. Jones, S.P. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection / S.P. Jones, R. Bolli // *J Mol Cell Cardiol.* – 2006. – Vol. 40, №1 – P. 16-23.
28. Kietadisorn, R. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities / R. Kietadisorn, P. Juni Rio, An. L. Moens // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 302. – P. E481–E495.
29. Koch, M.A. Influence of nitric oxide on the hemodynamic response to hemorrhage in conscious rabbits / M.A. Koch, E.M. Hasser, J.C. Schadt // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 37. – P. R171-R182.
30. Komamura, K. Similarities and differences between the pathogenesis and pathophysiology of diastolic and systolic heart failure / K. Komamura // *Cardiol. Res. Pract.* – 2013. 2013:824135. doi: 10.1155/2013/824135.
31. Linagliptin Attenuates the Cardiac Dysfunction Associated With Experimental Sepsis in Mice With Pre-existing Type 2 Diabetes by Inhibiting NF- κ B / A. S. Zoubi [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – 18;9:2996. doi: 10.3389/fimmu.2018.02996.
32. Liu, X.-J. High glucose enhances LPS-stimulated human PMVEC hyperpermeability via the NO pathway / X.-J. Liu, Z.-D. Zhang, X.-C. Ma // *Experimental and therapeutic medicine.* – Vol. 6. P. 361–367.
33. Manukhina, E.B. Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats / Manukhina, E.B., Jasti D., Vanin A.F., Downey H.F. // *Exp Biol Med.* – 2011. – Vol. 236. – P. 867-873.
34. Meerson, F.Z. *Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation.* – Moscow: Hypoxia Medical LTD – 1994.
35. Mir, S.A. An Improved Zinc Reduction Method for Direct Determination of Nitrate in Presence of Nitrite / S.A. Mir // *Asian Journal of Chemistry.* – 2007. – Vol. 19, №7. – P. 5703-5710
36. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S.Moncada, R.U. Palmer, E.A. Higgs // *Pharmacol. rev.* – 1991. – V. 43. – P. 109 - 142.

37. Mortality rate in patients with diastolic dysfunction and normal systolic function / C.M. Halley [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2011. – Vol. 171. – P. 1082–1087.
38. Nagareddy, P.R. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes / P.R. Nagareddy, Z. Xia, J.H. McNeill, K.M. MacLeod // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 5. – P. H2144–H2152.
39. Nakaki, T. Physiological and clinical significance of NO (nitric oxide) – a review / T. Nakaki // *Keio J. Med.* – 1994. – Vol.43. – P.15–26.
40. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. / Bloch W. [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 43. – P. 675–684.
41. Nox2 dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury / F. Wu [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2014. – Vol. 307. – P. L987–L997
42. Parish, J.M. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease / J.M. Parish, V.K. Somers // *Mayo Clin. Proc.* – 2004. – Vol. 79. – P. 1036–1046.
43. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide / R.B. Muijsers [et al.] // *Life. Sci.* – 1997. – Vol. 60. – P. 1833–1845.
44. Petros, A. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension with septic shock / A.Petros, D.Bennet, P.Vallance // *Lancet.* – 1991. – Vol. 338. – P. 1557–1558.
45. Recknagel, R.O. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes / R.O.Recknagel, E.A. Glende // *Methods Enzymol.* – 1984. Vol.105 – P. 331–337.
46. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart / T. Okazaki [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 50, № 3. – P. 534–544.
47. Rubanyi, G.M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals / G.M. Rubanyi // *Free Radic Biol Med.* – 1988. – Vol.4. – № 2. – P. 107–120.
48. Seal, J.B. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury / J.B. Seal, B.L. Gewertz // *Ann. Vasc. Surg.* – 2005. – V. 19. – P. 572–584
49. Smith, J.M. Inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME improves ventricular performance in streptozotocin-diabetic rats / J.M. Smith, D.J. Paulson, F.D. Romano // *J Mol Cell Cardiol.* – 1997. – Vol. 29, № 9. – P. 2393–2402.
50. Steven, P. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection / P.J. Steven, R. Bolli // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2006. – Vol. 40. – P. 16–23
51. Sun, J. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production / J. Sun, L.J. Druhan, J.L. Zweier // *Arch Biochem Biophys.* – 2010. – Vol. 494, № 2. – P.130–137.
52. The effects of modulating eNOS activity and coupling in ischemia/reperfusion (I/R) / K.A. Perkins [et al.] // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2012. – V. 385. – P. 27–38.
53. The effects of prenatal stress on expression of CaMK-II and L-Ca²⁺ channel in offspring hippocampus. / Q. Cai Q [et al.] // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* – 2011. – Vol. 43, №8. – P. 601–606.
54. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning / R. Bolli [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 1998. – Vol. 93. – P. 325–38
55. The role of Syk/IkB- α /NF- κ B pathway activation in the reversal effect of BAY 61-3606, a selective Syk inhibitor, on hypotension and inflammation in a rat model of zymosan-induced non-septic shock / D. Unsal [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018. – Vol. – 45, №2. – п P. 155–165. doi: 10.1111/1440-1681.12864.
56. Thiernemann, C. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in haemorrhagic shock are mediated by nitric oxide / C.Thiernemann, S.Szabo, J.A.Mitchell, J.R. Vane // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 267–261.

57. West, I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes / I.C. West // *Diabet. Med.* – 2000. – Vol. 17. – P. 171-180.
58. Yousif, M.H. Signal transduction through Ras-GTPase and Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinase II contributes to development of diabetes-induced renal vascular dysfunction / Yousif, M.H. // *Cell Biochem Funct.* – 2006. – Vol. 24, № 4. – P. 299-305.
59. Zhu, M. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells / M. Zhu, J. Chen, Z. Tan, J. Wang // *Anesth Analg.* – 2012. – Vol. 114, № 2. – P. 303–309.

ГЛАВА 5

НО-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ K_{ATP} - И VCa -КАНАЛОВ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ

При воздействии стрессоров на организм изменения развиваются на всех уровнях интеграции, включая и клеточный. Характерными проявлениями такого «Cell Denger Response» являются: изменение функции митохондрий, экспрессия белков теплового шока, стресс эндоплазматического ретикулума, развитие воспаления, ответ клетки на развивающийся в ней окислительный стресс, сдвиг анаболических процессов к синтезу мономеров, повышение жесткости клеточной мембраны, изменение эпигенетических механизмов регуляции генома, высвобождение мобильных генетических элементов, а также информирование об «опасности» клеток, находящихся на удалении от повреждаемых клеток. Изменения на клеточном уровне при стрессе вызывают изменения во всех органах и системах, в том числе в сердце и сосудах [27].

Одним из механизмов нарушения тонуса сосудов сердца при стрессе является дисфункция эндотелиоцитов, характеризующаяся гиперпродукцией монооксида азота (NO), активных форм кислорода (АФК), в частности супероксид-анионов, и других вазоактивных веществ [37]. При воздействии многочисленных вазоактивных эндотелиальных факторов релаксации важное значение имеет гиперполяризация, развивающаяся в результате активации калиевых каналов, находящихся в мембране гладкомышечных клеток. АТФ-чувствительные калиевые каналы и кальций-активируемые калиевые каналы (KCa -каналы) принимают участие в регуляции сосудистого тонуса [11, 28, 32].

Снижение функциональной активности калиевых каналов является одной из причин сосудистых «катастроф» при стрессе и сахарном диабете [22, 33], а ее увеличение при геморрагическом шоке сопровождается развитием гипореактивности сосудов [23].

Активность калиевых каналов может изменяться под влиянием эндогенных сосудорасширяющих веществ, таких как продукты P450 монооксигеназного пути, пероксид водорода, простагландин, NO [19]. Важнейшим из таких регуляторных факторов является NO, который может активировать калиевые каналы через G-белок зависимое фосфорилирование канала или путем активации растворимой гуанилатциклазы с последующим увеличением производства цГМФ [29]. В сосудистых ГМК цГМФ-зависимая активация этих каналов сопровождается фосфорилированием либо Slo1 или b1-регуляторных субъединиц. цГМФ-независимый механизм активации VCa -каналов может включать в себя связывание NO с тиолами (расположенные в субъединицах каналы), для создания дисульфидных мостиков с другими восстановленными тиолами [14].

Состояния, связанные с эндотелиальной дисфункцией, сопровождаются снижением биодоступности NO и, как следствие, нарушением тонуса сосудов сердца. Потенциальными кандидатами на участие в формировании ответа гладкомышечных клеток стенки коронарных сосудов при различных воздействиях являются K_{ATP} -каналы и VCa -каналы. Поскольку калиевые каналы принимают участие в эндотелий-зависимых реакциях, то активация этих каналов в эндотелиальных и / или ГМК может предотвратить возникновение дисфункции эндотелия. Поэтому, изучение функциональной активности этих каналов, представляет несомненный интерес для практической медицины и имеет важное значение в выработке целенаправленной терапевтической стратегии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Для повышения устойчивости организма к стрессу используются два основных подхода: фармакологический и нефармакологический. Использование фармакологических методов кардиопротекции часто сопровождается побочными эффектами. Формирование адаптации к повторным стрессовым воздействиям приводит к повышению устойчивости организма к стрессу без выраженных побочных эффектов. В связи с этим изучение

механизмов кардиопротекции при адаптации к коротким стрессорным воздействиям представляет особую актуальность.

Так, например, защитный эффект гипоксического preconditionирования сохраняется только 3-4 дня [12, 24], тогда как кардиопротекторный эффект, обусловленный адаптацией к периодической гипоксии, наблюдается более 35 дней. Это указывает на наличие существенных различий в механизмах ишемического preconditionирования и адаптации к гипоксии, возможно, связанных с адаптивной активацией синтеза протекторных белков при долговременной адаптации.

Поэтому изучение возможностей и механизмов долговременной адаптации представляет наибольший интерес.

Хорошо изучена роль эндотелиальной NO-синтазы при адаптации к стрессу. Многочисленные исследования механизмов защиты сердца при длительном и интенсивном адренергическом стрессе, позволили выявить некоторые внутриклеточные процессы, которые лежат в основе резистентности клеток к этому состоянию. Основными из них являются ограничение стрессорной активации перекисного окисления липидов мембран [7] и гиперпродукции NO, а также усиление его депонирования в эндотелии и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов [2], увеличение образования белков теплового шока [5, 30], сохранение функции ионных насосов и энергообразования в митохондриях [7]. Итогом срабатывания вышеуказанных внутриклеточных механизмов адаптации является предупреждение перегрузки кардиомиоцитов ионами кальция и, как следствие, развития кальциевых некрозов миокарда, а также избыточной продукции эндотелием коронарных сосудов NO, вносящего существенный вклад в возникновение постстрессовой гипотонии коронарных и других сосудов [3].

Подчеркивается важная роль и Ca_TF -каналов в формировании полноценного адаптивного ответа сердца при остром адренергическом стрессе. Так, физическая тренировка животных, в кардиомиоцитах которых отсутствовали Ca_TF -каналы, не сопровождалась развитием адаптации, а приводила к появлению некрозов миокарда, аритмий и внезапной смерти животного. Это позволило предположить, что данные ионные каналы играют важную роль в формировании устойчивости клеток сердца к стрессу [18].

Вопрос о взаимосвязи двух локальных систем регуляции тонуса сосудов и сократительной функции сердца – iNOS и ионных каналов в механизмах кардио- и вазопротекции остается мало изученным.

Величины объемной скорости коронарного потока (коронарный поток), индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический коронарный поток, коронарный расширительный резерв, а также сократительную активность миокарда и интенсивность перфузии определяли на сердцах крыс, изолированных по методу Лангендорфа (в условиях постоянного давления).

Сердце перфузировалось раствором Кребса-Хензелята следующего состава (мм/л): KCl - 4.8, MgSO_4 1.18, NaCl - 118, CaCl_2 - 2.5, KH_2PO_4 -1.2, NaHCO_3 - 25.0, глюкоза - 5.5, pH - 7.3-7.4, насыщенным карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2) при температуре + 37°C. После того как сердце изолировали, его помещали в установку для изолированного сердца IH-SR тип 844/1 (HSE-НА, ФРГ). Установка оборудована проточным флуометром (1RB-проточный, для флуометра TTFM тип 700, HSE) и датчиками для измерения аортального и внутрижелудочкового давлений (Isotec pressure transducer). Все измеряемые параметры обрабатывались при помощи программного обеспечения ACAD (HSE, ФРГ).

В течение всего эксперимента изолированное сердце находилось в термостатируемой камере. Первые 10 минут, необходимые для стабилизации сердца от аноксии, удаления крови, стабилизации ионов между раствором Кребса-Хензелята и внеклеточной жидкостью в аортальную канюлю перфузат подавали под давлением 40 мм рт.ст. Состав перфузата на протяжении всего опыта оставался постоянным вследствие того, что жидкость не рециркулировала. Температуру поддерживали на постоянном

уровне в течение всего эксперимента при помощи ультратермостата LAUDA HSE (ФРГ). Тонус сосудов и развиваемое внутрижелудочковое давление изучали на разных уровнях перфузионного давления 40, 60, 80, 100 и 120 мм рт.ст. При помощи шпindelного шприца осуществляли быстрое повышение давления, показатели которого отражались на манометре.

Способность сосудов отвечать сужением на их растяжение внутрикоронарным давлением по мере увеличения перфузионного давления, оценивали по индексу ауторегуляции, предложенному Е.Б.Новиковой (1972) [8]:

$$ИА = \frac{\Delta Q_1 - \Delta Q_2}{\Delta Q_1} ;$$

где ΔQ_1 – изменение исходного коронарного потока в момент подъема перфузионного давления, ΔQ_2 – разность между величиной исходного потока и потока, установившегося в процессе ауторегуляторной реакции при новом уровне давления. Коронарный расширительный резерв определяли при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. как отношение между величиной коронарного потока, найденного после 60-ти секундного прекращения перфузии (максимальный гиперемический коронарный поток) и исходным потоком.

Каждый эксперимент состоял из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелята. На втором этапе перфузировали таким же раствором, но с добавлением ингибитора $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмония (1 мМ). Вклад $ВК_{Ca}$ -каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта тетраэтиламмония, выраженного в процентах от исходного кровотока.

5.1. Влияние блокады NO-синтазы L-NAME на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших иммобилизационный стресс, экспериментальный сахарный диабет и их сочетание

Введение L-NAME в коронарное русло стрессированных животных частично устраняло характерное для стресса увеличение объемной скорости коронарного потока (рис. 5.1). Коронарный расширительный резерв не изменялся. Индекс ауторегуляции при перфузионном давлении 60 и 100 мм рт. ст. также был ниже контрольных показателей. Максимальный гиперемический коронарный поток не отличался от изолированных сердец с интактной системой синтеза монооксида азота, но был выше МГКП сердец обработанных блокатором конституциональной NO-синтазы (табл. 5.1). Развиваемое внутрижелудочковое давление оставалось сниженным по сравнению с контролем на 13-17% при перфузионном давлении 60 и 80 мм рт.ст. соответственно ($p < 0,05$, табл. 5.1). Несмотря на то, что блокада синтеза монооксида азота L-NAME ограничила характерное для стресса увеличение объемной скорости коронарного потока, все же она оставалась достоверно более высокой по сравнению с контрольной группой крыс, чьи сердца были обработаны L-NAME (рис. 5.1).

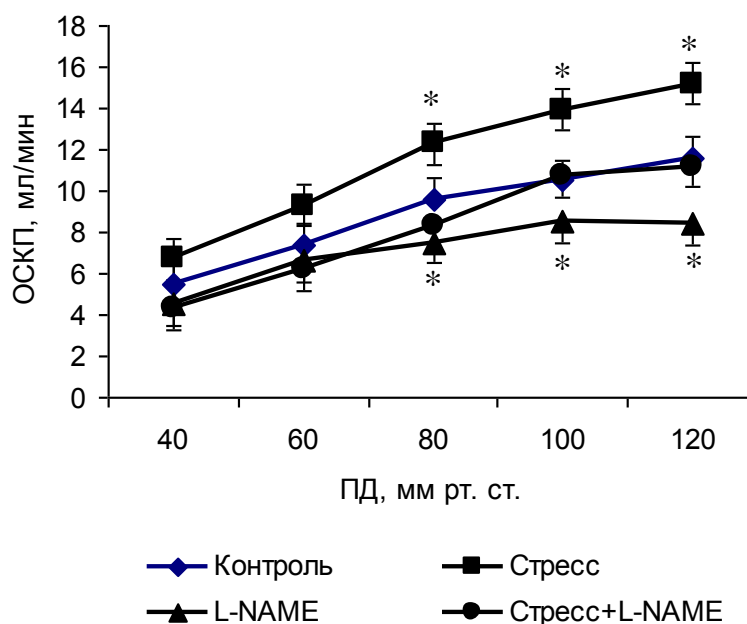


Рисунок 5.1. Влияние стресса на изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в условиях блокады синтеза конституциональной NO-синтазы. Примечание: по оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока в мл/мин. *- $p < 0,05$ по сравнению с группой стресс

Интракоронарное введение блокатора NO-синтазы L-NAME в изолированные сердца крыс с экспериментальным сахарным диабетом снижало объемную скорость коронарного потока при перфузионном давлении 120 мм рт.ст. на 14% ($p < 0,05$, по сравнению с группой животных с интактной системой монооксида азота, рис. 5.2), в то время как введение в перфузионный раствор L-NAME контрольной группы животных снижало ОСКП с 80 до 120 мм рт. ст. и составило 22, 20 и 28% соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, блокада синтеза монооксида азота, так же как и при стрессе, существенно ограничила, но полностью не предупредила характерное и для сахарного диабета увеличение объемной скорости коронарного потока.

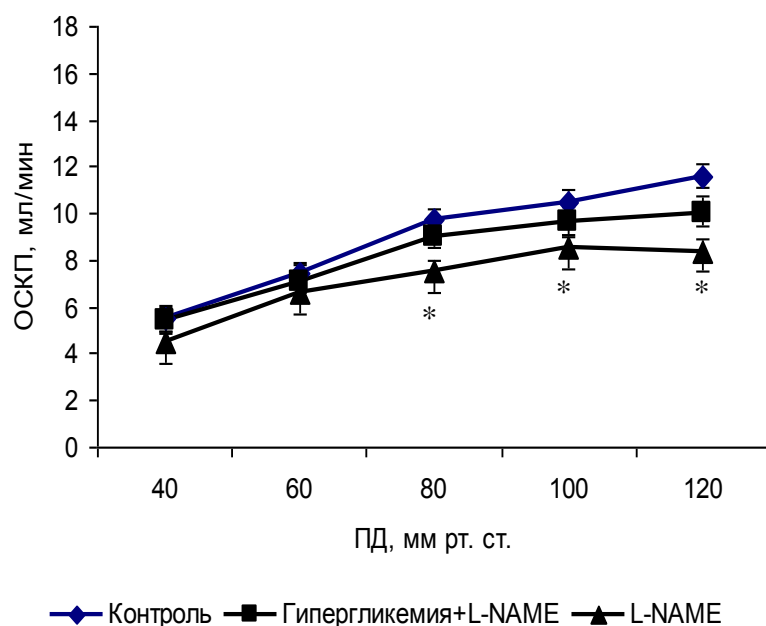


Рисунок 5.2. Влияние гипергликемии на изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в условиях блокады синтеза конституциональной NO-синтазы. Примечание: по оси абсцисс — перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат — объемная скорость коронарного потока в мл/мин. *- $p < 0,05$ по сравнению с группой контроль

Под влиянием блокатора синтеза монооксида азота индекс ауторегуляции не отличался от контрольных показателей с интактной системой синтеза NO, но был выше на 47%, по сравнению с группой животных с повышенным содержанием глюкозы в крови в условиях интактной системы монооксида азота при перфузионном давлении 60 и 80 мм рт.ст. ($p < 0,05$, табл. 5.1). Максимальный гиперемический коронарный поток снижался при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. на 25 и 18% соответственно (табл. 5.1). Однако, это снижение оставалось ниже, чем в контрольной группе животных, чьи сердца были обработаны L-NAME (табл. 5.1).

Коронарный расширительный резерв увеличивался на 14%, по сравнению с группой «сахарный диабет» с интактной системой синтеза NO и результаты стали сопоставимы с данными, полученными при действии L-NAME на контрольные сердца (табл. 5.1). Развиваемое внутрижелудочковое давление снижалось при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 35%, а интенсивность перфузии снизилась при перфузионном давлении 80-120 мм рт. ст. на 48-30% и не отличалась от контрольной группы животных с сохраненной NO-синтазой (табл. 5.1).

Введение в коронарное русло изолированных сердец крыс перенесших стресс на фоне сахарного диабета L-NAME, снижало объемную скорость коронарного потока при перфузионном давлении 100 и 120 мм рт. ст. на 12 и 18% соответственно, что было выражено в той же степени что и в группе животных с сахарным диабетом (рис. 5.2). Под влиянием блокатора монооксида азота, в группе животных «сахарный диабет+стресс», индекс ауторегуляции возвращался к контрольным показателям с сохраненной системой синтеза монооксида азота, однако, по сравнению с группой животных перенесших стресс на фоне сахарного диабета с интактной системой синтеза NO, индекс ауторегуляции стал выше в среднем на 43% при перфузионном давлении от 60 до 100 мм рт. ст. ($p < 0,05$, табл. 5.1). Максимальный гиперемический поток, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт. ст. под воздействием L-NAME снижался на 28 и 15% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 5.1). Эти показатели оставались более низкими,

чем в контрольных сердцах, обработанных блокатором синтеза монооксида азота (для сравнения в группе «L-NAME» снижение составило 36 и 32%).

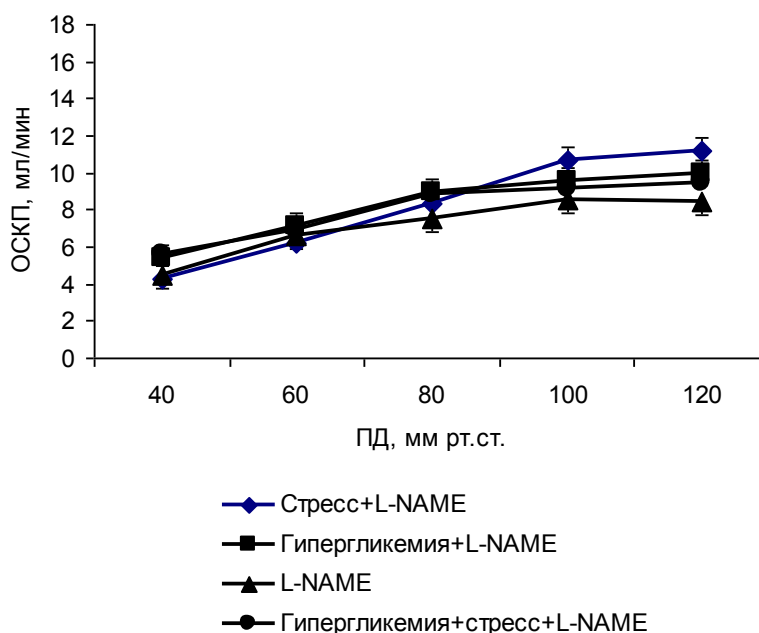


Рисунок 5.2. Влияние сочетанного воздействия гипергликемии и стресса на изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в условиях блокады синтеза конституциональной NO-синтазы. Примечание: по оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока в мл/мин. *- $p < 0,05$ по сравнению с группой L-NAME

Следовательно, в группе животных «сахарный диабет+стресс», блокада NO лишь частично ограничила изменения в отношении ОСКП и МГКП. Коронарный расширительный резерв увеличился только при перфузионном давлении 120 мм рт.ст. на 37%, по сравнению с такой же группой в условиях интактного синтеза NO, и не отличался от контрольных сердец обработанных L-NAME. Под воздействием блокатора синтеза монооксида азота развиваемое внутрижелудочковое давление снижалось при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 27%, а интенсивность перфузии при этом оставалась более высокой, чем в контрольных сердцах, как с интактной, так и блокированной системой синтеза монооксида азота (табл. 5.1). Этот факт указывает на то, что сочетанное воздействие гипергликемии и стресса, приводит к еще более выраженному повреждению тонуса коронарных сосудов, которое лишь частично ограничивается блокатором L-NAME.

Таблица 5.1. Влияние тетраэтиламмония и его сочетания с блокатором NO-синтазы L-NAME на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии у крыс, перенесших стресс, сахарный диабет и их сочетании

Показатель	Группа животных	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
		40	60	80	100	120
Индекс ауторегуляции, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	-	0,28±0,02*	0,21±0,04*	0,58±0,06	0,65±0,71
	L-NAME (n=8)	-	0,46±0,09	0,71±0,1*	0,73±0,07	0,97±0,07
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	-	0,27±0,08*	0,53±0,10	0,41±0,10***	0,91±0,10
	Гипергликемия+L-NAME (n=7)		0,54±0,05	0,56±0,07*	0,72±0,05	0,82±0,06***
	Гипергликемия+стресс+L-NAME (n=6)		0,57±0,02	0,46±0,03	0,83±0,05*	0,88±0,07
Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	-	-	16,2±0,75	-	20,6±0,56
	L-NAME (n=8)	-	-	11,4±0,8*	-	13,7±0,8*
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	-	-	14,4±0,6**	-	18,8±0,90**
	Гипергликемия+L-NAME (n=7)	-	-	13,3±0,60***	-	16,4±0,80***
	Гипергликемия+стресс+L-NAME (n=6)	-	-	12,8±0,70*	-	17,0±0,83***
Коронарный расширительный резерв	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	-	-	1,26±0,03***		1,28±0,04***
	L-NAME (n=8)	-	-	1,66±0,11	-	1,70±0,10
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	-	-	1,70±0,80	-	1,90±0,20
	Гипергликемия+L-NAME (n=7)			1,60±0,1*		1,60±0,1*
	Гипергликемия+стресс+L-NAME (n=6)			1,50±0,1*		1,80±0,1*

Продолжение таблицы 5.1

Развиваемое внутрижелудочково е давление мм×рт.ст.	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	43,0±3,0*	78,0±2,9*	99,0±3,9*	108,0±4,7	113,0±4,1
	L-NAME (n=8)	62,0±3,0	89,0±6,0	106,0±5,0	113,0±5,0	121,0±4,0
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	53,0±7,0	75,0±1,0*	87,0±2,2*	99,0±9,0	106,0±9,0
	Гипергликемия+ L-NAME (n=7)	53,0±6,0	63,0±7,0*	86,0±15,0*	90,0±6,0*	98,0±7,0*
	Гипергликемия+стресс+L- NAME (n=6)	44,0±3,0*	68,0±8,0*	74,0±6,0*	89,0±10,0*	92,0±10,0*
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	0,91±0,13*	0,71±0,06*	0,54±0,03*	0,54±0,03*	0,56±0,01*
	L-NAME (n=8)	0,26±0,01	0,26±0,01	0,25±0,01	0,23±0,01	0,27±0,03
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	0,28±0,03	0,33±0,04	0,24±0,03	0,21±0,02	0,31±0,03
	Гипергликемия+ L-NAME (n=7)	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Гипергликемия+стресс+L- NAME (n=6)	0,60±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль», n – количество животных в группе; ** - $p < 0,05$ по сравнению с группой «L-NAME»

5.2. Влияние блокады индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевиной на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших иммобилизационный стресс, на фоне экспериментального сахарного диабета

Введение в перфузионный раствор S-метилизотиомочевины (S-MT), селективного блокатора индуцированной NO-синтазы, не оказывало влияния на объемную скорость коронарного потока и сократительную функцию миокарда в контрольной группе животных. Интракоронарное введение S-MT в группе животных, перенесших стресс, приводило к снижению ОСКП при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 24% и не отличалось от контрольных показателей. К увеличению тонуса коронарных сосудов (то есть к увеличению индекса ауторегуляции в среднем на 80%, по сравнению с группой стресс до введения блокатора, табл. 5.1). Максимальный гиперемический поток под влиянием S-MT снижался при перфузионном давлении 80 мм рт. ст. на 18% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 5.1) и не отличался от показателей контрольной группы крыс с блокированной индуцибельной NO-синтазой. Коронарный расширительный резерв, развиваемое внутрижелудочковое давление и интенсивность перфузии были выражены в той же степени, что и в контроле (табл. 5.1). Таким образом, образующаяся при стрессе индуцибельная NO-синтаза, эффективно блокируется селективным блокатором S-метилизотиомочевиной.

В группе животных «сахарный диабет» селективная блокада индуцибельной NO-синтазы предупреждала характерное для сахарного диабета увеличение объемной скорости коронарного потока, возвращая ее к контрольным показателям (рис. 5.3). При этом наблюдалось увеличение индекса ауторегуляции в среднем на 40% по сравнению с группой «сахарный диабет» в условиях интактной системы синтеза NO (табл. 5.2). Максимальный гиперемический поток под влиянием S – метилизотиомочевины снижался при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. на 31 и 18% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 5.2), но не отличался от показателей контрольной группы крыс с блокированной индуцибельной NO-синтазой. Коронарный расширительный резерв, развиваемое внутрижелудочковое давление и интенсивность перфузии при интракоронарном введении S-метилизотиомочевины не отличались от контроля (табл. 5.2).

В группе животных «сахарный диабет+стресс» селективная блокада индуцибельной NO-синтазы предупреждала характерное для сахарного диабета увеличение объемной скорости коронарного потока, возвращая ее к контрольным показателям. Максимальный гиперемический поток под влиянием S – метилизотиомочевины снижался при перфузионном давлении 80 мм рт.ст. на 16% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем), но не отличался от показателей контрольной группы крыс с блокированной индуцированной NO-синтазой. Развиваемое внутрижелудочковое давление и интенсивность перфузии при интракоронарном введении S-метилизотиомочевины не отличались от контроля (табл. 5.2).

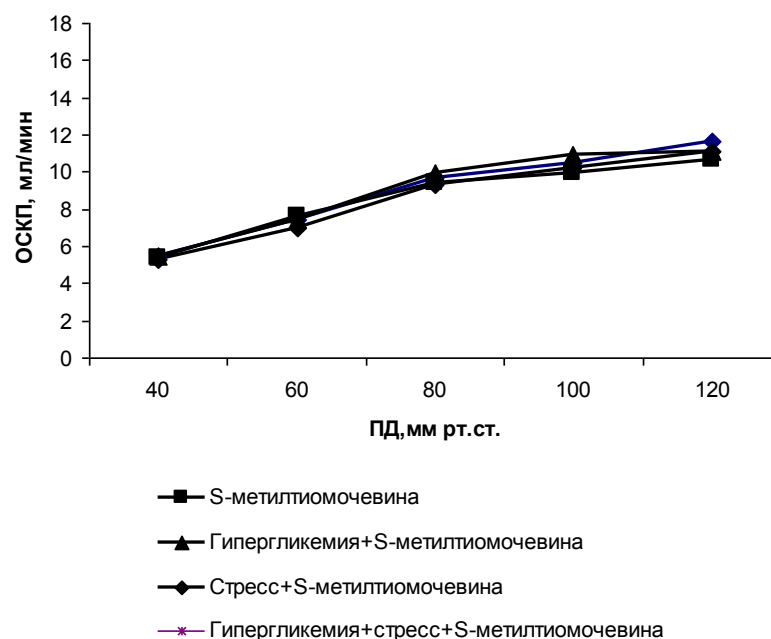


Рисунок 5.3. Влияние сочетанного воздействия сахарного диабета и стресса на изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в условиях блокады синтеза индуцибельной NO-синтазы. Примечание: по оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока в мл/мин. *- $p < 0,05$ по сравнению с группой S-метилтиомочевина

Следовательно, при сахарном диабете, также как и при стрессе и их сочетании образуется индуцибельная NO-синтаза, что сопровождается нарушением показателей ауторегуляции и сократительной функции миокарда, которые эффективно устраняются S-метилизотиомочевинной.

Таблица 5.2. Влияние гипергликемии, стресса и их сочетанного воздействия на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, развиваемое внутрижелудочковое давление и интенсивность перфузии на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы S-метилтиотиомочевинной (S-MT)

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Индекс ауторегуляции, мл×мм рт.ст. ⁻¹	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	0,40±0,03	0,40±0,03	0,70±0,20	0,70±0,04
	Сахарный диабет + S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	0,51±0,04	0,61±0,05	0,62±0,05	0,92±0,07*
	Сахарный диабет +стресс S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	0,38±0,04	0,63±0,14	0,85±0,05	1,0±0,1*
	Стресс+ S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT		0,51±0,06	0,50±0,06	0,71±0,11	0,71±0,03
	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	13,4±0,46*	-	17,1±0,61
Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	Сахарный диабет + S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	12,2±0,41*	-	16,5±0,40*
	Сахарный диабет +стресс S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	15,0±0,20*	-	17,7±0,83
	Стресс+ S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT			14,1±0,99*	-	18,6±0,50
	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	1,53±0,07	-	1,59±0,06
	Сахарный диабет + S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	1,74±0,10	-	1,69±0,10
Коронарный расширительный резерв	Сахарный диабет +стресс S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	1,70±0,10	-	1,70±0,10
	Стресс+ S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT	-	-	1,70±0,10	-	1,65±0,11
	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT					
	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT					
	S-метилтиотиомочевина (n=6)	S-MT					

Продолжение таблицы 5.2

Развиваемое внутрижелудочков ое давление мм×рт.ст.	S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	57,0±6,2	76,0±6,4	93,0±9,8	105,0±7,2	112,0±5,3
	Сахарный диабет + S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	64,0±7,0	89,0±14,0	100,0±8,0	116,0±13,0	117,0±13,0
	Сахарный диабет +стресс S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	66,0±9,0	82,0±12,0	110,0±16,0	115,0±16,0	120,0±16,0
	Стресс+ S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	64,0±4,0	97,0±1,6	108,0±3,3	122,0±7,1	124,0±5,7
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	0,50±0,10	0,50±0,10	0,40±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Сахарный диабет + S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	0,40±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Сахарный диабет +стресс S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Стресс+ S-метилтиомочевина (n=6)	S-MT	0,40±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,20±0,10	0,30±0,10

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль», n – количество животных в группе.

5.3. Влияние интракоронарного введения блокатора NO-синтазы (L-NAME) и VK_{Ca} -каналов на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших стресс на фоне сахарного диабета

Введение в перфузионный раствор тетраэтиламмония в условиях блокады синтеза NO в изолированных сердцах крыс, перенесших 6-ти часовой иммобилизационный стресс, снижало объемную скорость коронарного потока при перфузионном давлении от 80 до 120 мм рт.ст. в среднем на 16, 20, 21%, (что было выражено в меньшей степени, чем в контрольной группе животных, как на фоне блокады, так и с интактной системой синтеза NO) (рис. 5.4, Б). При этом индекс ауторегуляции не изменялся (табл. 5.3). После блокады тетраэтиламмонием VK_{Ca} -каналов и блокады синтеза монооксида азота, максимальный гиперемический коронарный поток, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст., снизился на 15 и 10% соответственно (для сравнения в контрольной группе на фоне блокады монооксида азота - в среднем на 26%, рис. 5.4, Б).

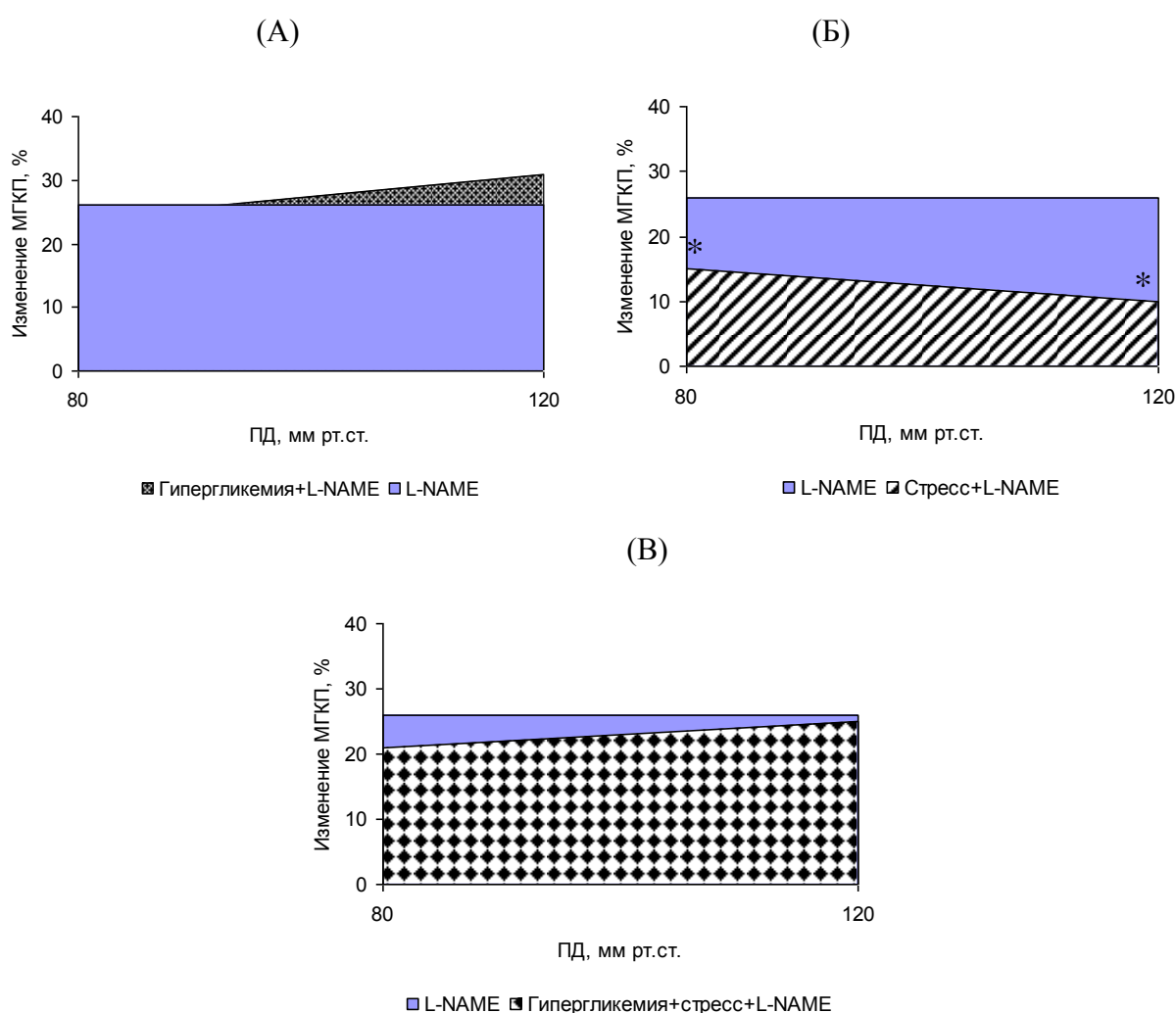


Рисунок 5.4. Влияние тетраэтиламмония и блокатора синтеза монооксида азота L-NAME на изменения максимального гиперемического потока в группах животных: (А) гипергликемия, (Б) стресс, (В) сочетанное влияние гипергликемии и стресса. Примечание: по оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – % изменения. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «L-NAME»

В изолированных сердцах крыс, перфузируемых раствором Кребса-Хензелята, содержащим блокатор синтеза монооксида азота (L-NAME) интракоронарное введение тетраэтиламмония в группе животных с сахарным диабетом, снижало объемную скорость коронарного потока при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 28% (для сравнения, в условиях блокады системы синтеза монооксида азота, в среднем на 32%). При этом увеличивался индекс ауторегуляции при перфузионном давлении 40-60, 60-80, 80-100 мм рт.ст. на 32, 46 и 28% соответственно (табл. 5.3). Под влиянием ТЭА и L-NAME максимальный гиперемический коронарный поток, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст., снизился на 24 и 31% соответственно (в контроле, в условиях блокады синтеза NO и $ВК_{Ca}$ -каналов, в среднем на 26%). Коронарный расширительный резерв достоверно не изменялся (табл. 5.3). Под влиянием тетраэтиламмония развиваемое внутрижелудочковое давление также, как и в условиях интактного синтеза NO не изменялось. Интенсивность перфузии при этом достоверно не изменялась (табл. 5.3). Следовательно, блокада монооксида азота L-NAME существенно ограничивает нарушения функциональной активности $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов в группе животных «сахарный диабет».

При сочетании сахарного диабета и стресса интракоронарное введение L-NAME и ТЭА снижало ОСКП при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 21% ($p < 0,05$, для сравнения, в контрольных сердцах, обработанных L-NAME, снижение составило 32%). Индекс ауторегуляции увеличился при перфузионном давлении от 80 до 100 мм рт.ст. в среднем на 29%, что было выражено в меньшей степени, чем в контрольной группе животных, чьи сердца обрабатывали L-NAME (табл. 5.3). Максимальный гиперемический поток снижался на 21 и 25% и не отличался от сердец, обработанных L-NAME. Коронарный расширительный резерв, развиваемое внутрижелудочковое давление и интенсивность перфузии не изменялись. Следовательно, блокада синтеза монооксида азота ограничивает нарушения функциональной активности гладкомышечных клеток венечных сосудов при сочетанном воздействии сахарного диабета и стресса. Этот факт дает основание полагать, что стресс усугубляет негативные последствия гипергликемии.

Таблица 5.3. Влияние тетраэтиламмония (ТЭА) и его сочетания с блокатором конституциональной NO-синтазы на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии крыс, перенесших 6-часовую иммобилизацию на фоне сахарного диабета

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Индекс ауторегуляции, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	Без ТЭА	-	0,28±0,02*	0,21±0,04*	0,58±0,06	0,65±0,71
		С ТЭА	-	0,37±0,05*	0,37±0,04*#	0,53±0,07*	0,60±0,05
	L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	0,46±0,09	0,71±0,1*	0,73±0,07	0,97±0,07
		С ТЭА	-	0,60±0,1*#	0,90±0,03*#	0,84±0,07*#	0,97±0,02*#
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	0,27±0,08*	0,53±0,10	0,41±0,10***	0,91±0,10
		С ТЭА	-	0,40±0,07#	0,50±0,07	0,50±0,04*	0,90±0,07*
	Сахарный диабет+L-NAME (n=7)	Без ТЭА		0,54±0,05	0,56±0,07*	0,72±0,05	0,82±0,06***
		С ТЭА		0,71±0,02*	0,82±0,07*	0,91±0,07*	1,0±0,02
Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	Гипергликемия+стресс+L-NAME (n=6)	Без ТЭА		0,57±0,02	0,46±0,03	0,83±0,05*	0,88±0,07
		С ТЭА		0,66±0,05	0,64±0,04#	1,00±0,03#	0,95±0,03
	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	Без ТЭА	-	-	17,5±0,75*		20,6±0,56
		С ТЭА	-	-	16,4±0,69*		16,9±0,99*#
	L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	-	11,4±0,8*	-	13,7±0,8*
		С ТЭА	-	-	8,4±0,8#*	-	10,1±1,30#*
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	-	14,4±0,6**	-	18,8±0,90**
		С ТЭА	-	-	12,3±0,8#	-	16,9±0,90#
	Сахарный диабет +L-NAME (n=7)	Без ТЭА			13,3±0,60*		16,4±0,80*
		С ТЭА			10,1±0,68#		11,2±0,80#
	Сахарный диабет +стресс+L-NAME (n=6)	Без ТЭА			12,8±0,70*		17,0±0,83***
		С ТЭА			10,1±0,40#		12,7±1,20#

Продолжение таблицы 5.3

Коронарный расширительный резерв	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	Без ТЭА	-	-	1,26±0,03***	1,28±0,04***
		С ТЭА	-	-	1,30±0,03***	1,28±0,06***
	L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	-	1,66±0,11	1,70±0,10
		С ТЭА	-	-	1,80±0,10*	1,90±0,09*
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	Без ТЭА	-	-	1,70±0,80	1,90±0,20*
		С ТЭА	-	-	1,80±0,10	1,90±0,10*
Развиваемое внутрижелудочково е давление мм×рт.ст.	Сахарный диабет + L-NAME (n=7)	Без ТЭА			1,60±0,1	1,60±0,1*
		С ТЭА			1,80±0,1*	1,90±0,1*
	Сахарный диабет +стресс+L-NAME (n=6)	Без ТЭА			1,50±0,1*	1,80±0,1*
		С ТЭА			1,60±0,1	1,90±0,1*
	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	Без ТЭА	43,0±3,0*	78,0±2,9*	99,0±3,9*	108,0±4,7
		С ТЭА	43,0±3,2*	77,0±2,5	90,0±3,1	96,0±3,2
	L-NAME (n=8)	Без ТЭА	62,0±3,0	89,0±6,0	106,0±5,0	113,0±5,0
		С ТЭА	57,0±2,0	82,0±5,0	89,0±6,0	93,0±6,0
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	Без ТЭА	53,0±7,0	75,0±1,0*	87,0±2,2*	99,0±9,0
		С ТЭА	51,0±7,0	71,0±9,0	85,0±9,0	94,0±7,0
	Гипергликемия+ L-NAME (n=7)	Без ТЭА	32,0±6,0*	61,0±7,0*	72,0±15,0*	78,0±6,0
		С ТЭА	44,0±2,0	46,0±3,0	57,0±5,0	57,0±4,0
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. -1	Сахарный диабет +стресс+L-NAME (n=6)	Без ТЭА	51,0±3,0*	75,0±8,0*	80,0±6,0*	101,0±10,0*
		С ТЭА	50,0±5,0	63,0±7,0	75,0±10,0	74,0±16,0
	Стресс 6ч +цитратный буфер (n=7)	Без ТЭА	0,91±0,13*	0,71±0,06*	0,54±0,03*	0,56±0,01*
		С ТЭА	0,88±0,14*	0,69±0,07*	0,54±0,04*	0,54±0,02*
	L-NAME (n=8)	Без ТЭА	0,26±0,01	0,26±0,01	0,25±0,01	0,23±0,01
		С ТЭА	0,25±0,02	0,22±0,03	0,21±0,03	0,19±0,03
	Стресс 6 ч+L-NAME (n=8)	Без ТЭА	0,28±0,03	0,33±0,04	0,24±0,03	0,21±0,02
		С ТЭА	0,30±0,03	0,36±0,04	0,25±0,03	0,22±0,02
	Сахарный диабет + L-NAME (n=7)	Без ТЭА	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10
		С ТЭА	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10
	Сахарный диабет +стресс+L-NAME (n=6)	Без ТЭА	0,60±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10
		С ТЭА	0,40±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10

Примечание: #- р<0,05 по сравнению с данными, полученными при перфузии изолированного сердца данной группы раствором Кребса-Хензеляйта, не содержащим тетраэтиламмоний; *- р<0,05 по сравнению с группой «контроль», n – количество животных в группе. **,- р<0,05 по сравнению с группой «L-NAME»

5.4. Влияние интракоронарного введения блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины и VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмония на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда у крыс, перенесших стресс на фоне экспериментального сахарного диабета

В группе животных «сахарный диабет» добавление в перфузионный раствор блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины (S-MT) и тетраэтиламмония (ТЭА) снижало ОСКП при перфузионном давлении от 60 до 120 мм рт.ст. в среднем на 21%, что было выражено в той же степени, что и в контрольной группе крыс с блокированной индуцибельной NO-синтазой и достоверно не отличалось от группы животных с интактной системой синтеза монооксида азота. Индекс ауторегуляции увеличивался при перфузионном давлении от 60 до 100 мм рт.ст. в среднем на 24% (табл. 5.4). В отношении максимального гиперемического потока коронароконстрикторный эффект ТЭА и S-MT составил 19 и 22%, что было выражено в той же степени, что и в группе интактных животных (для сравнения в контроле на 18-19%, табл. 5.4). Коронароконстрикторный эффект, развиваемое внутрижелудочковое давление, и интенсивность перфузии не изменялись (табл. 5.4).

Интракоронарное введение в перфузионный раствор ТЭА и S-MT в группе животных, перенесших стресс, сопровождалось снижением ОСКП в области ауторегуляции (60-120 мм рт.ст.) в среднем на 26%, то есть в той же степени, что и в контроле. Наблюдалось увеличение индекса ауторегуляции при перфузионном давлении 80-100 мм рт.ст. на 28%. Максимальный гиперемический поток под воздействием блокаторов возвращался к контрольным показателям, снижение составило 16-18% (табл. 5.4). Коронароконстрикторный эффект, развиваемое внутрижелудочковое давление, и интенсивность перфузии не изменялись (табл. 5.4).

В группе животных, перенесших стресс на фоне предварительного сахарного диабета, сочетанная блокада индуцибельной NO-синтазы и VK_{Ca} -каналов приводила к снижению ОСКП при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 27%, при этом индекс ауторегуляции увеличивался при перфузионном давлении 40-60 мм рт.ст. на 71%. МГКП снижался при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. на 26 и 25% соответственно. Коронарный расширительный резерв, сократительная функция миокарда и интенсивность перфузии не изменялись (табл. 5.4).

Так как о функциональной активности VK_{Ca} -каналов судили по вазоконстрикторному эффекту тетраэтиламмония, можно заключить, что блокада индуцибельной NO-синтазы полностью предупредила нарушения функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов после перенесенного стресса, сахарного диабета и их сочетания.

Таблица 5.4. Влияние тетраэтиламмония и его сочетания с блокатором индуцибельной NO-синтазы на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии у крыс, перенесших стресс, сахарный диабет и их сочетание

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Индекс ауторегуляции, мл×мм рт.ст. ⁻¹	S-метилтиоомочевина (n=6)	S-MT	-	0,40±0,03	0,40±0,03	0,70±0,20	0,70±0,04
		S- MT+ТЭА	-	0,40±0,02	0,60±0,13#	0,90±0,06*#	0,80±0,06
	Гипергликемия +	S-MT	-	0,51±0,04	0,61±0,05	0,62±0,05	0,92±0,07*
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	0,71±0,02#	0,72±0,05#	0,73±0,11#	1,0±0,05*
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S-MT	-	0,38±0,04	0,63±0,14	0,85±0,05	1,0±0,1*
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	0,65±0,09#	0,75±0,12	0,85±0,06	0,88±0,07
	Стресс+	S-MT		0,51±0,06	0,50±0,06	0,71±0,11	0,71±0,03
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА		0,61±0,09	0,51±0,10	0,91±0,08*#	0,80±0,10
Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	S-метилтиоомочевина (n=6)	S-MT	-	-	13,4±0,46	-	17,1±0,61
		S- MT+ТЭА	-	-	10,4±0,36#	-	13,7±0,83#
	Гипергликемия +	S-MT	-	-	12,2±0,41	-	16,5±0,40
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	-	9,9±0,30#	-	12,9±0,30#
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S-MT	-	-	15,0±0,20	-	17,7±0,83
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	-	11,0±0,42	-	13,3±0,90#
	Стресс+	S-MT			14,1±0,99	-	18,6±0,50
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА			11,8±0,70#	-	15,2±0,90#
Коронарный расширительный резерв	S-метилтиоомочевина (n=6)	S-MT	-	-	1,50±0,07	-	1,59±0,06
		S- MT+ТЭА	-	-	1,40±0,04	-	1,70±0,08
	Гипергликемия +	S-MT	-	-	1,4±0,10	-	1,5±0,10
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	-	1,5±0,10	-	1,5±0,10
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S-MT	-	-	1,7±0,10*	-	1,7±0,10*
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	-	1,7±0,10	-	1,7±0,10
	Стресс+	S-MT	-	-	1,37±0,10	-	1,51±0,11
	S-метилтиоомочевина (n=6)	S- MT+ТЭА	-	-	1,45±0,10	-	1,54±0,10

Продолжение таблицы 5.4

Развиваемое внутрижелудочково е давление мм×рт.ст.	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	57,0±6,2	76,0±6,4	93,0±9,8	105,0±7,2	112,0±5,3
	Гипергликемия +	S- MT+TЭА	53,0±4,9	72,0±6,2	87,0±11,3	102,0±7,5	108,0±5,1
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	64,0±7,0	89,0±14,0	100,0±8,0	116,0±13,0	117,0±13,0
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S- MT+TЭА	54,0±10,0	71,0±12,0	75,0±14,0	75,0±12,0	80,0±13,0
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	66,0±9,0	82,0±12,0	110,0±16,0	115,0±16,0	120,0±16,0
	Стресс+	S- MT+TЭА	55,0±6,0	63,0±9,0	73,0±10,0#	80,0±10,0#	85,0±11,0#
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	64,0±4,0	97,0±1,6	108,0±3,3	122,0±7,1	124,0±5,7
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S- MT+TЭА	58,0±1,3	88,0±3,7	104,0±2,9	108,0±2,9	114,0±1,4
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	0,50±0,10	0,50±0,10	0,40±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Гипергликемия +	S- MT+TЭА	0,50±0,10	0,40±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	0,40±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S- MT+TЭА	0,50±0,10	0,60±0,10	0,40±0,10	0,40±0,10	0,40±0,10
Стресс+	S-метилглтиомочевина (n=6)	S-MT	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Стресс+	S-MT	0,40±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,20±0,10	0,30±0,10
	S-метилглтиомочевина (n=6)	S- MT+TЭА	0,40±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,20±0,10	0,30±0,10

Примечание: #- p<0,05 по сравнению с данными, полученными при перфузии изолированного сердца данной группы раствором Кребса-Хензелята, не содержащим тетраэтиламмоний; *- p<0,05 по сравнению с группой «контроль», n – количество животных в группе.

5.5. Вклад конституциональной и индуцибельной NO-синтазы в развитие нарушения функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при стрессе, сахарном диабете и их сочетании

В контрольной группе животных на фоне блокады индуцированной и конституциональной NO-синтазы наблюдалось снижение ОСКП при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 23% ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), индекс ауторегуляции увеличивался на 28%. Максимальный гиперемический поток, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст., снижался на 36 и 33% соответственно. Развиваемое внутрижелудочковое давление, коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии не изменялись (табл. 5.5).

Добавление в перфузионный раствор блокатор кальцийактивируемых калиевых каналов тетраэтиламмония сопровождалось еще в большей степени снижением ОСКП, которое составило в среднем 32% (в контроле, в условиях интактной системы синтеза монооксида азота на 26%, в группе «L-NAME» - 32%, в группе «S-MT» - 21%), при этом индекс ауторегуляции увеличивался на 30%. МГКП при этих же условиях снизился на 20 и 25% (для сравнения, в контроле на 23-27 %, в группе «L-NAME» на 27%, а в группе «S-MT» на 22%).

Развиваемое внутрижелудочковое давление коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии под влиянием тетраэтиламмония не изменялись (табл. 5.5). Таким образом, показатели коронарной ауторегуляции и сократительной функции миокарда были выражены в той же степени, что и под влиянием одного блокатора L-NAME.

Тот факт, что S-MT вызывает коронароконстрикторный эффект выраженный в меньшей степени чем введение в перфузионный раствор L-NAME, а эффект от их сочетания выражен в той же степени, что и при блокаде только конституциональной NO-синтазы, подтверждает сделанное нами ранее предположение о том, что эндотелиальный монооксид азота подавляет активность ВКСа-каналов и модулирует функциональную активности данных каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов, находясь с ними в реципрокной зависимости.

В группе животных с гипергликемией после блокады, индуцированной и конституциональной NO-синтазы наблюдалось снижение ОСКП при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 28%, при этом индекс ауторегуляции увеличивался при перфузионном давлении от 80 до 120 мм рт. ст. на 20%. МГКП, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. снижался по сравнению с контролем на 40 и 33% соответственно. Развиваемое внутрижелудочковое давление, коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии были выражены в той же степени, что и в контроле с интактной системой синтеза монооксида азота. Интракоронарное введение тетраэтиламмония в условиях совместной блокады конституциональной и индуцированной NO-синтазы приводило к закономерному снижению ОСКП в среднем на 37% (в группе «гипергликемия+ L-NAME» снижение составило 30%, а в группе «гипергликемия+ S-MT» - 21%). МГКП снижался на 16 и 19% (табл. 5.5, для сравнения в контроле с интактной системой синтеза монооксида азота на 18 и 19%). Индекс ауторегуляции, развиваемое внутрижелудочковое давление, и интенсивность перфузии не изменялись (табл. 5.5). Коронарный расширительный резерв под влиянием ТЭА увеличивался, указывая на улучшение способности сосуда к растяжению. Таким образом, блокада конституциональной и индуцированной NO-синтазы как совместно, так и по отдельности предупреждает снижение функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов, вызываемое гипергликемией.

Совместное добавление в перфузионный раствор L-NAME и S-MT в группе животных, перенесших стресс, сопровождалось снижением ОСКП в среднем на 26% и

увеличением индекса ауторегуляции в среднем на 19%. МГКП не отличался от контрольных показателей интактных животных. Развиваемое внутрижелудочковое давление не изменялось, а коронарный расширительный резерв увеличивался по сравнению с действием L-NAME и S-MT каждого из блокаторов в отдельности. Интенсивность перфузии не изменялась и была сопоставима с показателями контрольных интактных животных. Добавление в перфузионный раствор тетраэтиламмония сопровождалось коронарokonстрикторной реакцией. Так вазоконстрикторный эффект в отношении ОСКП составил в среднем 25% (рис. 4.6, Б), МГКП – 20%. Под влиянием ТЭА индекс ауторегуляции, развиваемое внутрижелудочковое давление, коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии не изменялись.

Сочетанное влияние гипергликемии и стресса, в присутствии в перфузионном растворе блокатора L-NAME и S-MT, характеризовалось снижением ОСКП в среднем на 26%, то есть в той же степени, что и при стрессе, на фоне сочетанной блокады конституциональной и индуцированной NO-синтазы. Индекс ауторегуляции был выражен в той же степени, что и в контрольной группе животных с интактной системой синтеза монооксида азота. Максимальный гиперемический поток и развиваемое внутрижелудочковое давление были сопоставимы с данными контрольной группы животных с интактной системой синтеза монооксида азота (табл. 5.5). Под влиянием блокаторов коронарный расширительный резерв увеличивался на 52% по сравнению с группой животных, перенесших стресс на фоне предварительной гипергликемии с интактной системой синтеза монооксида азота. Интенсивность перфузии была такой же, как и в контрольной группе животных с интактной системой синтеза монооксида азота. Сочетание в перфузионном растворе блокаторов синтеза монооксида азота (L-NAME и S-MT) и ВКС_{Ca}-каналов приводило к снижению объемной скорости коронарного потока при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 26% (рис. 4.6, В), при этом индекс ауторегуляции увеличивался на 35%, а максимальный гиперемический коронарный поток при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст. на 20 и 22% соответственно. Развиваемое внутрижелудочковое давление, коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии под влиянием ТЭА не изменялись (табл. 5.5).

Таким образом, совместная блокада конституциональной и индуцибельной NO-синтазы полностью предупреждает снижение функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов в равной степени, как и введение в перфузионный раствор S-MT, в отличие от L-NAME, который лишь частично ограничивает нарушение тонуса сосудов. Этот факт позволяет предположить, что NO, образующийся iNOS является одним из патогенетических механизмов подавления функциональной активности ВКС_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при сахарном диабете и его сочетании со стрессом.

Таблица 5.5. Влияние тетраэтиламмония, его сочетания с блокаторами конституциональной и индуцированной NO-синтаз на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии гипергликемических крыс, до и после перенесенного 6-часового стресса

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Индекс ауторегуляции, мл×мм рт.ст. ⁻¹	S-метилтиомочевина+ L-NAME (n=8)	S-метилизотиомочевина+ L-NAME	-	0,55±0,03	0,50±0,07	0,87±0,07	0,89±0,07
		S-метилизотиомочевина+ L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	0,78±0,05*	0,66±1,10	1,00±0,08	0,96±0,04
	Гипергликемия + S-метилтиомочевина L-NAME (n=6)	S-метилизотиомочевина+ L-NAME	-	0,71±0,08	0,31±0,01	0,85±0,04	0,89±0,03
		S-метилизотиомочевина+ L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	0,81±0,03	0,56±0,10*	1,0±0,1*	0,77±0,02
	Гипергликемия+стресс 6ч+ S-метилтиомочевина L-NAME (n=6)	S-метилизотиомочевина+ L-NAME	-	0,35±0,01	0,32±0,02	0,69±0,06	0,83±0,07
		S-метилизотиомочевина+ L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	0,35±0,06	0,77±0,19*	1,0±0,07*	1,0±0,05
	Стресс+ L-NAME+S-метилтиомочевина (n=6)	S-метилизотиомочевина+ L-NAME		0,70±0,07	0,86±0,04	0,85±0,07	0,81±0,03
		S-метилизотиомочевина+ L-NAME+ тетраэтиламмоний		0,74±0,08	0,93±0,10	0,92±0,06	0,95±0,02

Продолжение таблицы 5.5

Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	S-метилтиоомочевина+L-NAME (n=8)	S-метилизотиоомочевина+L-NAME	-	-	11,2±0,3	-	13,5±0,5
		S-метилизотиоомочевина+L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	-	9,0±0,3*	-	10,1±0,5*
	Гипергликемия + S-метилтиоомочевина L-NAME (n=6)	S-метилизотиоомочевина+L-NAME	-	-	10,7±0,20	-	13,5±0,70
		S-метилизотиоомочевина+L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	-	9,5±0,10	-	11,1±0,30*
	Гипергликемия+стресс 6ч+ S-метилтиоомочевина L-NAME (n=6)	S-метилизотиоомочевина+L-NAME	-	-	15,24±1,39	-	20,16±1,16
		S-метилизотиоомочевина+L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	-	12,48±1,51	-	14,16±1,21*
	Стресс+ L-NAME+S-метилтиоомочевина (n=6)	S-метилизотиоомочевина+L-NAME	-	-	19,3±0,55	-	23,4±0,54
		S-метилизотиоомочевина+L-NAME+ тетраэтиламмоний	-	-	16,8±0,77	-	22,2±1,06
	S-метилтиоомочевина+L-NAME (n=8)	S-MT+ L-NAME	-	-	1,50±0,10	-	1,70±0,10
		S-MT+ L-NAME + тетраэтиламмоний	-	-	1,80±0,10	-	2,00±0,10
Коронарный расширятельный резерв	Гипергликемия + S-метилтиоомочевина L-NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME	-	-	1,9±0,1	-	1,7±0,1
		S-MT+ L-NAME + тетраэтиламмоний	-	-	2,4±0,2*	-	2,1±0,1*
	Гипергликемия+стресс 6ч+ S-метилтиоомочевина L-NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME	-	-	2,1±0,2	-	2,0±0,1
		S-MT+ L-NAME + тетраэтиламмоний	-	-	2,0±0,2	-	1,9±0,2
	Стресс+ L-NAME+S-метилтиоомочевина (n=6)	S-MT+ L-NAME	-	-	3,0±0,44	-	2,9±0,34
		S-MT+ L-NAME + тетраэтиламмоний	-	-	2,8±0,32	-	2,8±0,15

Продолжение таблицы 5.5

Развиваемое внутрижелудочк овое давление мм×рт.ст.	S-метилтиомочевина+L- NAME (n=8)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	67,0±8,0	71,0±8,0	95,0±10,0	105,0±10,0	110,0±10,0
	Гипергликемия + S- метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	64,0±4,0	69,0±13,0	91,0±15,0	101,0±13,0	105,0±13,0
	Гипергликемия + S- метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	60,0±6,0	74,0±7,0	90,0±6,0	100,0±12,0	107,0±12,0
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	58,0±3,0	63,0±6,0	88,0±6,0	100,0±6,0	100,0±8,0
	S-метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	55,0±15,0	70,0±13,0	89,0±14,0	98,0±11,0	102,0±12,0
	Стресс+ L-NAME+S- метилтиомочевина (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	52,0±14,0	70,0±10,0	87,0±9,0	89,0±10,0	100,0±10,0
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	60,0±2,8	76,0±6,4	87,0±6,5	105,0±6,1	113,0±7,0
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	58,0±3,2	76,0±6,3	86,0±5,8	100,0±7,3	108,0±4,7
	S-метилтиомочевина+L- NAME (n=8)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Гипергликемия + S- метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,20±0,10	0,30±0,10
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Гипергликемия + S- метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,60±0,10	0,60±0,10	0,40±0,10	0,30±0,10	0,50±0,10
	Гипергликемия+стресс 6ч+	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	S-метилтиомочевина L- NAME (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,50±0,10	0,50±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
	Стресс+ L-NAME+S- метилтиомочевина (n=6)	S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,40±0,10	0,40±0,10	0,30±0,10	0,30±0,10	0,40±0,10
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,44±0,01	0,45±0,04	0,43±0,03	0,36±0,01	0,36±0,01
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний	0,33±0,03	0,29±0,02	0,29±0,03	0,27±0,03	0,25±0,02
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний					
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний					
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний					
		S-MT+ L-NAME тетраэтиламмоний					

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с данными, полученными при перфузии изолированного сердца данной группы раствором Кребса-Хензеляйта, не содержащим тетраэтиламмоний; n – количество животных в группе.

Учитывая тот факт, что NO, образующийся iNOS является одним из ключевых патогенетических механизмов подавления функциональной активности VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при экспериментальном сахарном диабете и его сочетании со стрессом, на следующем этапе изучали только влияние блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевина на функциональную активность K_{ATF} -каналов

5.6. Роль iNOS в регуляции функциональной активности VK_{Ca} - и K_{ATF} -калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, при экспериментальном сахарном диабете

Эксперименты выполнены на беспородных крысах-самках (n=156), распределенных по группам: (1) «контроль»; (2) «сахарный диабет» (модель экспериментального сахарного диабета описана выше).

Каждая группа включала 3 подгруппы: 1 – добавление в перфузионный раствор блокатора VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмония (ТЭА) или глибенкламида (ГЛБ), блокатора K_{ATF} -каналов; 2 – содержание в перфузате блокатора iNOS S-метилизотиомочевина (S-MT); 3 – совместное добавление в перфузионный раствор ТЭА/ГЛБ и S-MT.

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по Лангендорфу в условиях постоянного давления (методика описана выше). Для изучения роли NO, продуцируемого iNOS, в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли высокоселективный блокатор iNOS S-метилизотиомочевину (S-MT, 10^{-6}M , Sigma, USA). Для изучения роли K_{ATF} -каналов и VK_{Ca} -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в перфузионный раствор добавляли блокатор K_{ATF} -каналов глибенкламид (ГЛБ, который растворяли в DMSO - Dimethyl sulfoxide) в концентрации 10 мкМ, или блокатор VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 1 мМ. Вклад этих каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта глибенкламида или тетраэтиламмония, соответственно, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления, выраженного в % от исходного.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%;75%]. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p < 0,05$).

В сердцах животных группы «сахарный диабет» - коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление снижались на 23 и 35%, соответственно (табл. 5.6, рис. 5.5). Данный факт свидетельствует о снижении тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Добавление в перфузионный раствор блокатора iNOS при перфузии сердца животных группы «сахарный диабет» приводило к восстановлению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции сердца до контрольных значений. Таким образом, высокие концентрации NO, образуемого iNOS при экспериментальном сахарном диабете, имеют важное значение в механизмах ослабления тонуса коронарных сосудов и снижения сократительной функции миокарда.

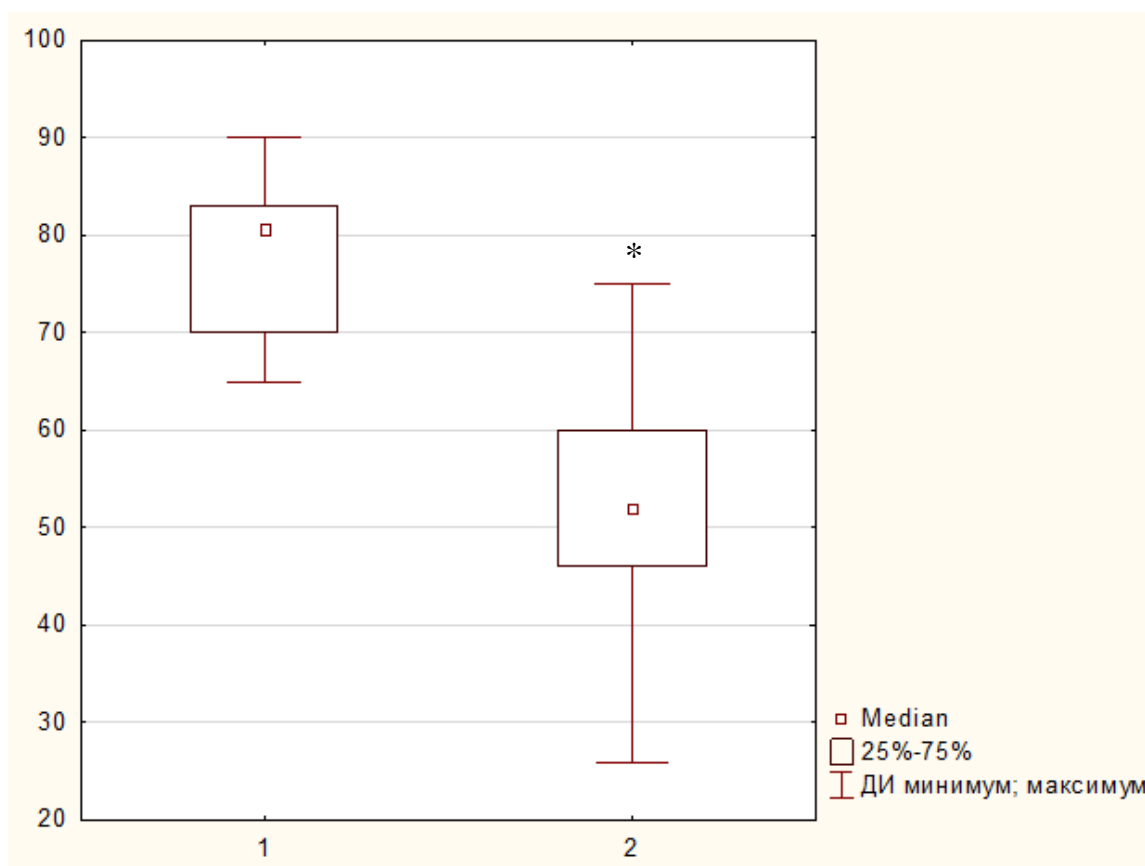


Рисунок 5.5. Влияние сахарного диабета на величину развиваемого внутрижелудочкового давления. Примечание: По оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль»; 2 – «Сахарный диабет»; по оси ординат – величина развиваемого внутрижелудочкового давления в мм рт. ст.; [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал. * - $p < 0,0027$, по сравнению с группой «Контроль»

Введение ГЛБ в коронарное русло изолированного сердца крыс с сахарным диабетом сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 64%, т.е. в этой группе коронарореконстрикторный эффект ГЛБ был на 28% меньше, чем в контроле (табл. 5.6). РВД при этом снижалось на 18% (для сравнения, снижение РВД в контроле составило 29%, рис. 29). Следовательно, сахарный диабет снижал эффективность действия ГЛБ в отношении величины коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда, что может быть обусловлено снижением функциональной активности K_{ATP} -каналов, как гладкомышечных, так и эндотелиальных клеток. В изолированных сердцах крыс группы «сахарный диабет» на фоне блокады синтеза NO (с помощью S-MT) интракоронарное введение ГЛБ увеличивало коронарное перфузионное давление на 86% и снижало развиваемое внутрижелудочковое давление на 28%, что было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и K_{ATP} -каналов (табл. 5.6).

Таблица 5.6 Влияние глибенкламида и S-метилизотиомочевины на изменение коронарного перфузионного давления при экспериментальном сахарном диабете

Группы экспериментальных животных	Показатель	Условия перфузии миокарда. КПП, мм рт.ст., при ОСКП 10 мл/мин.			
		Без блокатора (n=8)	C S-метилизотиомочевинной (n=10)	C глибенкламидом (n=8)	C глибенкламидом и S-метилизотиомочевинной (n=10)
Контроль	Медиана, %	81,00	90,00	157,50	160,50
	Размах (Min-Max), %	60,00-95,00	63,00-100,00	125,00-167,00	115,00-184,00
	95% ДИ для медианы, %	71,60-90,40	79,70-100,30	144,20-170,80	144,37-176,30
	25;75 процентиль, %	72,50;85,50	76,30;100,00	137,50;161,30	142,75;176,50
	p			p2<0,0009	P2<0,0009
Сахарный диабет	Показатель	Без блокатора (n=8)	C S-метилизотиомочевинной (n=8)	C глибенкламидом (n=8)	C глибенкламидом и S-метилизотиомочевинной (n=8)
	Медиана, %	55,50	84,00	96,50	155,00
	Размах (Min-Max), %	50,00-64,00	74,00-96,00	77,00-100,0	145,00-165,00
	95% ДИ для медианы, %	51,86-59,14	77,90-90,10	89,45-103,55	149,34-161,66
	25;75 процентиль, %	54,75;58,25	78,5;88,25	90,75;98,00	151,75;161,50
	p	P1<0,0019	P2<0,0009	P1<0,0009; p2<0,0009	P2<0,0009

Примечание: p1<0,05 – по сравнению с контрольной группой животных; p2 <0,05 - по сравнению с той же группой, но без блокатора. n – количество животных в группе. КПП – коронарное перфузионное давление; ОСКП – объемная скорость коронарного потока.

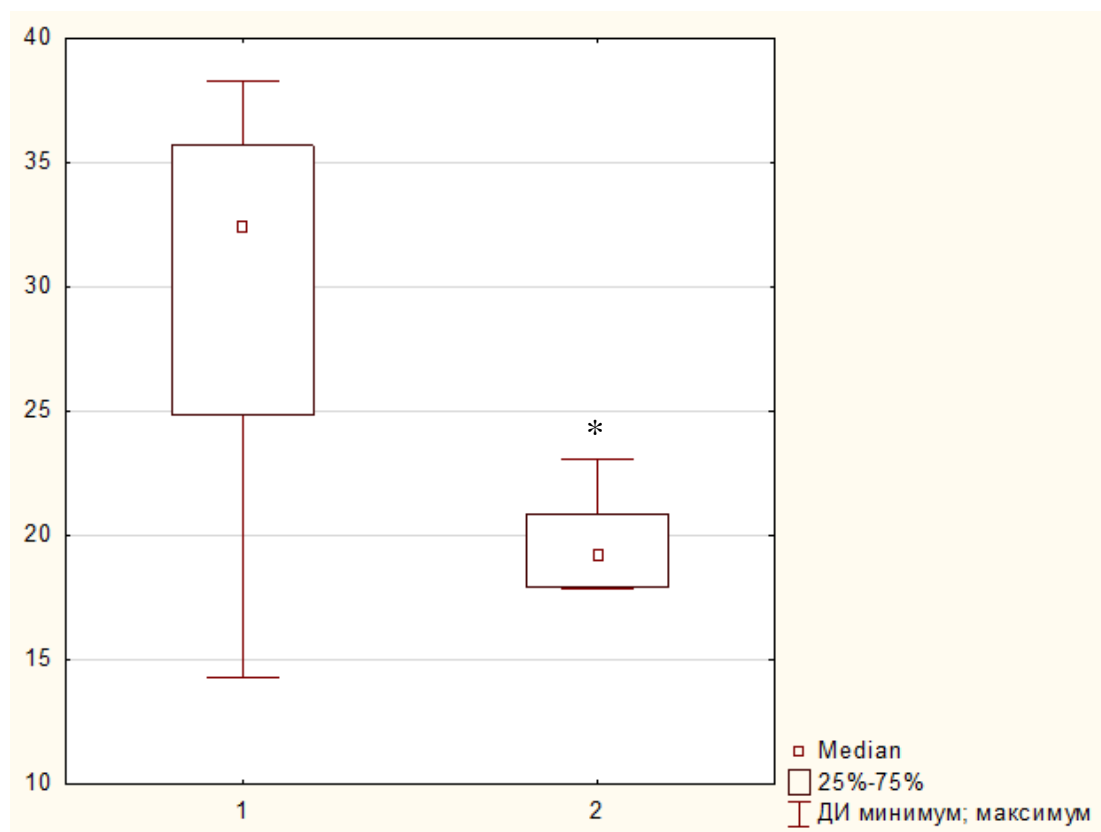


Рисунок 5.6. Влияние глибенкламида на изменение величины развиваемого внутрижелудочкового давления при экспериментальном сахарном диабете. Примечание: По оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль+глибенкламид»; 2 – «Сахарный диабет+глибенкламид»; по оси ординат – изменение величины развиваемого внутрижелудочкового давления, выраженное в %: [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал.* - $p < 0,031$, по сравнению с группой «Контроль+глибенкламид»

Введение ТЭА в коронарное русло изолированного сердца крыс с сахарным диабетом сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 66%, что было на 30% меньше, чем выраженность коронароконстрикторного эффекта ТЭА в контроле (табл. 5.7), а РВД при этом не изменялось. Следовательно, сахарный диабет снижал эффективность действия ТЭА в отношении величины коронарного перфузионного давления, что может быть обусловлено снижением функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. В изолированных сердцах крыс группы «сахарный диабет» на фоне блокады синтеза NO (с помощью S-MT) интракоронарное введение ТЭА увеличивало коронарное перфузионное давление на 84%, что было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и BK_{Ca} -каналов (табл. 5.7).

Таким образом, хроническая гипергликемия у крыс с сахарным диабетом существенно подавляет функциональную активность как K_{ATP} -каналов, так и BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и создает выраженную зависимость их активности от функционирования iNOS.

Таблица 5.7 Влияние тетраэтиламмония и S-метилизотиомочевины на изменение коронарного перфузионного давления при экспериментальном сахарном диабете

Группы экспериментальных животных	Показатель	Условия перфузии миокарда. КППД, мм рт.ст., при ОСКП 10 мл/мин.			
		Без блокагора (n=8)	C S-метилизотиомочевойной (n=8)	C тетраэтиламмонием (n=8)	C тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=8)
Контроль	Медиана, %	81,00	87,00	160,00	173,00
	Размах (Min-Max), %	75,00-95,00	75,00-100,00	140,00-179,00	139,00-181,00
	95% ДИ для медианы, %	75,30-86,30	79,63-94,37	151,00-169,00	158,60-187,40
	25;75 процентиль, %	77,50;85,00	81,50;95,80	155,80;165,00	147,30;177,50
	p			p2<0,0005	P2<0,0009
Сахарный диабет	Показатель	Без блокагора (n=8)	C S-метилизотиомочевойной (n=7)	C тетраэтиламмонием (n=8)	C тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=7)
	Медиана, %	62,00	90,00	102,00	169,00
	Размах (Min-Max), %	33,00-67,00	70,00-109,00	57,00-110,00	140,00-185,00
	95% ДИ для медианы, %	52,40-71,6	76,00-103,00	86,30-117,80	153,60-184,40
	25;75 процентиль, %	55,80;65,00	78,00;103,00	90,00;108,00	151,00;176,00
	p	P1<0,009	P2<0,0014	P1<0,0009; p2<0,0073	P2<0,0009

Примечание: p1<0,05 – по сравнению с контрольной группой животных; p2 <0,05 - по сравнению с той же группой, но без блокагора. n – количество животных в группе. КППД – коронарное перфузионное давление; ОСКП – объемная скорость коронарного потока.

Снижение функциональной активности K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов при экспериментальном сахарном диабете в значительной мере были обусловлены гиперпродукцией оксида азота, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой. В пользу этого вывода свидетельствуют, во-первых: увеличение коронароконстрикторного действия блокаторов ТЭА и ГЛБ при перфузии сердец животных с экспериментальным сахарным диабетом, раствором, содержащим высокоселективный блокатор iNOS; во вторых – 5-кратное увеличение концентрации в сыворотке крови этих крыс iNOS, а также умеренное накопление этого фермента в гладкомышечных и эндотелиальных клетках коронарных сосудов, наблюдаемым при иммуногистохимическом исследовании; в-третьих, системное увеличение активности фермента iNOS при неизменной активности eNOS, наряду с достоверным повышением содержания в крови стабильных продуктов деградации оксида азота – нитратов/нитритов. Обнаружение двукратного увеличения содержания С-реактивного белка и пятикратное ИЛ-1 β в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом отражает не только развитие в этих условиях системного воспаления низкой интенсивности, но и объясняет один из механизмов активации iNOS в этих условиях. Выявленное нами и другими исследователями [17] системное воспаление низкой интенсивности, развивающееся при хронической гипергликемии, объясняет частое возникновение при этом сосудистых «катастроф», важнейшим звеном патогенеза которых является плохо контролируемое воспаление в сосудистой стенке [13].

Рассуждая таким образом, можно предположить, что последовательность событий, приводящих к уменьшению функциональной активности K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов после экспериментального сахарного диабета, может быть следующей (схема 5.1):



Схема 5.1. Механизм нарушения функциональной активности K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов, вызванные экспериментальным сахарным диабетом

Пероксинитрит, образующийся при взаимодействии NO с супероксидным радикалом, наряду с другими активными формами кислорода могут окислять и/или, нитрозировать сульфгидрильные группы в составе белковых молекул К_{АТФ}- и ВК_{Са}-каналов, с последующим снижением функциональной активности этих каналов [9, 38].

Таким образом, установлено, что снижение функциональной активности К_{АТФ}- и ВК_{Са}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете в значительной мере обусловлено стимуляцией индуцибельной NO-синтазы, которая в этих условиях может продуцировать не только оксид азота, но и активные формы кислорода. Полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении фенотипических характеристик клеток сердца и его сосудов при экспериментальном стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете, что может объяснять специфический характер сосудистых реакций. Дальнейшее изучение механизмов регуляции тонуса кровеносных сосудов будет полезным для разработки новых методов профилактики и лечения сосудистых «катастроф» у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа с учетом роли iNOS и калиевых каналов в патогенезе нарушений механизмов регуляции сосудистого тонуса.

5.7. Роль iNOS в регуляции функциональной активности ВК_{Са}- и К_{АТФ}-калиевых каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу

Предполагают, что важнейший вазоактивный эндотелиальный фактор – оксид азота (NO), может модулировать активацию АТФ-чувствительных калиевых каналов через увеличение образования вторичного посредника цГМФ. Так, цГМФ-зависимые протеинкиназы способны фосфорилировать домены К_{АТФ}-каналов, тем самым способствуя изменению их функциональной активности и реализации кардиопротекторных эффектов [34, 35]. Кроме того, известно о прямой активации митохондриальных К_{АТФ}-каналов экзогенным NO [26]. В ряде исследований было показано, что активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) вносит существенный вклад в формирование эффектов пре- и посткондиционирования и адаптации к факторам среды [15, 16, 21]. Однако роль NO, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой, в модуляции функциональной активности К_{АТФ}-каналов и развитии адаптационных механизмов не изучалась.

Эксперименты выполнены на изолированных по Лангендорфу сердцах, в условиях постоянного потока (методика описана ранее) на беспородных крысах-самках, распределенных по группам: (1) «контроль»; (2) «стресс»; (3) «адаптация»; (4) «адаптация+стресс». Каждая группа включала 3 подгруппы: 1 – добавление в перфузионный раствор блокатора ВК_{Са}-каналов тетраэтиламмония (ТЭА) или глибенкламида (ГЛБ), блокатора К_{АТФ}-каналов; 2 – содержание в перфузате блокатора iNOS S-метилизотиомочевина (S-MT); 3 – совместное добавление в перфузионный раствор ТЭА/ГЛБ и S-MT.

Для изучения роли NO, продуцируемого iNOS, в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли высокоселективный блокатор iNOS S-метилизотиомочевину (S-MT, 10⁻⁶М, Sigma, USA). Для изучения роли К_{АТФ}-каналов или ВК_{Са}-каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в перфузионный раствор добавляли блокатор К_{АТФ}-каналов глибенкламид (ГЛБ) в концентрации 10 мкМ или ТЭА в концентрации 1 мМ. Вклад каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца определяли по величине вазоконстрикторного эффекта блокатора, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления, выраженного в % от исходного.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel».

Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p < 0,05$).

В группе контрольных животных коронарное перфузионное давление (КПД), определяемое при ОСКП 10 мл/мин, составляло 81 мм рт. ст., а развиваемое внутрижелудочковое давление – 70 мм рт.ст. (табл. 5.8) Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора S-MT не приводило к существенному изменению коронарного перфузионного давления и сократительной функции сердца контрольной группы животных. Интракоронарное введение блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламида в контроле сопровождалось повышением коронарного перфузионного давления на 92% ($p < 0,05$, по сравнению с КПД, зарегистрированным в сердцах контрольных животных с интактными K_{ATP} -каналами), и снижением развиваемого внутрижелудочкового давления на 29% ($p < 0,05$, по сравнению с РВД, зарегистрированным в сердцах контрольных животных с интактными K_{ATP} -каналами, табл. 5.9). Совместная блокада iNOS и K_{ATP} -каналов в сердцах контрольных животных сопровождалась коронароконстрикторным эффектом глибенкламида, выраженным в той же степени, что без добавления блокатора S-MT.

Таблица 5.8. Влияние стресса и адаптации на изменение коронарного перфузионного давления изолированного сердца крысы

Показатель	Группы экспериментальных животных и условия перфузии миокарда			
	Контроль без блокатора (n=8)	Стресс без блокатора (n=8)	Адаптация без блокатора (n=8)	Адаптация+стресс без блокатора (n=8)
Медиана, %	81,00	64,00	76,00	79,50
		$p_1 < 0,0009$		
Размах (Min-Max), %	75,00-95,00	55,00-69,00	69,00-86,00	72,00-86,00
95% ДИ для медианы, %	75,73-86,27	59,89-68,11	71,41-80,56	75,40-83,60
25-75 процентыль, %	77,50-85,00	59,00-65,50	74,50-80,25	75,75-80,00
	Контроль с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	87,00	81,00	80,50	80,50
		$P_2 < 0,0026$		
Размах (Min-Max), %	75,00-100,00	65,00-88,00	65,00-96,00	72,00-85,00
95% ДИ для медианы, %	79,63-94,37	75,14-86,86	69,73-91,27	76,86-84,14
25-75 процентыль, %	81,50-95,75	78,50-83,50	66,00-89,75	79,00-83,50
	Контроль с глибенкламидом (n=8)	Стресс с глибенкламидом (n=8)	Адаптация с глибенкламидом (n=8)	Адаптация+стресс с глибенкламидом (n=8)
Медиана, %	157,00	101,00	132,00	160,00
	$P_1 < 0,017$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,017; P_3 < 0,0014$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$
Размах (Min-Max), %	125,00-167,00	96,00-139,00	106,00-142,00	96,00-182,00
95% ДИ для медианы, %	144,20-170,80	88,90-113,10	122,60-142,40	132,70-187,20
25-75 процентыль, %	137,50-161,30	97,70-107,50	124,80-140,30	137,00-165,00
	Контроль с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	160,50	170,00	171,00	175,50
	$P_1 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$
Размах (Min-Max), %	115,00-184,00	150,00-175,00	138,00-198,00	166,00-180,00
95% ДИ для медианы, %	144,40-176,60	161,70-177,30	152,90-189,10	171,20-179,80
25-75 процентыль, %	142,80-176,50	163,00-173,50	154,80-190,50	172,00-177,30

Примечание: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой животных без блокатора; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с той же группой, но без блокатора S-МТ; $p_3 < 0,05$ – по сравнению с группой контроля, содержащей глибенкламид. n – количество животных в группе.

Таблица 5.9. Влияние стресса и адаптации на изменение развиваемого внутрижелудочкового давления изолированного сердца крысы

Показатель	Группы экспериментальных животных и условия перфузии миокарда			
	Контроль без блокагора (n=8)	Стресс без блокагора (n=8)	Адаптация без блокагора (n=8)	Адаптация+стресс без блокагора (n=8)
Медиана, %	70,00	45,00	64,00	65,00
		$p_1 < 0,0009$		
Размах (Min-Max), %	40,00-104,00	30,00-60,00	50,00-82,00	55,00-90,00
95% ДИ для медианы, %	62,20-77,80	39,70-50,30	57,50-70,50	54,90-75,00
25-75 процентиль, %	59,50-81,00	40,00-50,50	55,00-70,00	59,30-72,50
	Контроль с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	68,50	60,00	61,50	57,50
		$P_3 < 0,0026$		
Размах (Min-Max), %	60,00-100,00	40,00-120,00	50,00-76,00	40,00-93,00
95% ДИ для медианы, %	58,70-78,30	33,10-86,80	55,50-67,60	43,40-71,60
25-75 процентиль, %	60,00-75,00	50,00-89,50	60,00-70,00	50,00-65,80
	Контроль с глибенкламидом (n=8)	Стресс с глибенкламидом (n=8)	Адаптация с глибенкламидом (n=8)	Адаптация+стресс с глибенкламидом (n=8)
Медиана, %	53,00	46,00	54,00	46,00
	$P_1 < 0,017$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,017; P_3 < 0,0014$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$
Размах (Min-Max), %	43,00-69,00	35,00-53,00	50,00-70,00	40,00-69,00
95% ДИ для медианы, %	46,20-59,80	41,50-50,50	48,10-59,80	37,60-54,40
25-75 процентиль, %	49,50-60,00	40,70-47,20	52,00-61,30	42,00-52,50
	Контроль с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с глибенкламидом и S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	50,00	45,00	45,00	45,50
	$P_1 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$
Размах (Min-Max), %	43,00-87,00	33,00-60,00	40,00-50,00	33,00-80,00
95% ДИ для медианы, %	40,70-59,20	36,50-53,50	40,10-49,10	32,40-58,60
25-75 процентиль, %	47,30-58,50	37,50-48,50	41,50-50,00	34,80-52,00

Примечание: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой животных без блокагора; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с той же группой, но без блокагора S-МТ; $p_3 < 0,05$ – по сравнению с группой контроля, содержащей глибенкламид. n – количество животных в группе.

Полученные данные указывает на то, что в контроле индуцибельная NO-синтаза либо не образуется, либо ее активность крайне невысока, а, следовательно, наряду с эндотелиальной NO-синтазой [14], К_{АТФ}-каналы принимают участие в регуляции сосудистого тонуса и сократительной функции миокарда в физиологических условиях.

В сердцах животных, перенесших стресс, коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление снижались в равной степени в среднем на 23%, по сравнению с контрольными показателями ($p < 0,05$, табл. 5.8). Данный факт свидетельствует о постстрессорном снижении тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. Добавление в перфузионный раствор блокатора iNOS при перфузии сердца животных, перенесших стресс, приводило к восстановлению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции сердца до контрольных значений. Таким образом, NO, образуемый iNOS при стрессе, имеет важное значение в механизмах ослабления тонуса коронарных сосудов и снижения сократительной функции миокарда. Введение глибенкламида в коронарное русло изолированного сердца крыс, перенесших 6-часовую иммобилизацию, сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 76%, что было на 16% меньше, чем в контроле ($p < 0,05$, табл. 5.8), а также снижением РВД на 21% ($p < 0,05$, для сравнения, снижение РВД в контроле составило 28%, табл. 5.9). Следовательно, стресс снижал эффективность действия глибенкламида в отношении величины коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда, что может быть обусловлено снижением функциональной активности К_{АТФ}-каналов, как гладкомышечных, так и эндотелиальных клеток. В изолированных сердцах крыс группы «стресс» на фоне блокады синтеза NO (с помощью S-MT) интракоронарное введение глибенкламида увеличивало коронарное перфузионное давление на 88% и снижало развиваемое внутрижелудочковое давление на 32%, что было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и К_{АТФ}-каналов.

Таким образом, интенсивный эмоционально-болевой стресс у крыс существенно подавляет активность К_{АТФ}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и создает выраженную зависимость их активности от функционирования iNOS.

В сердцах животных, адаптированных к стрессу, коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление не отличались от таковых в контроле. Добавление в перфузионный раствор S-MT не сопровождалось изменениями коронарного перфузионного давления и сократительной функции сердца адаптированных к стрессу животных. Под влиянием глибенкламида коронарное перфузионное давление увеличивалось на 74% в группе животных «адаптация», что было меньше, чем в контроле, на 18% ($p < 0,05$, табл. 5.8), а развиваемое внутрижелудочковое давление под действием глибенкламида уменьшалось всего лишь на 13% ($p < 0,05$, табл. 5.9). Таким образом, после адаптации к стрессу наблюдалось уменьшение выраженности действия глибенкламида в отношении тонуса сосудов сердца и сократительной функции миокарда, что было расценено нами как следствие снижения функциональной активности К_{АТФ}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. Однако, совместное интракоронарное введение S-MT и глибенкламида сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 126%, и уменьшением сократительной функции миокарда на 30% (табл. 5.8, 5.9). Таким образом, блокада iNOS не только восстановила функциональную активность К_{АТФ}-каналов кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток коронарных сосудов до контрольных значений, но и существенно увеличила ее. Следовательно, во-первых, при адаптации к стрессу образуется iNOS, во-вторых, существует выраженная зависимость между функциональной активностью К_{АТФ}-каналов и NO, продуцируемым iNOS. Вероятно, усиленная продукция NO, характерная для адаптации, ограничивает активацию К_{АТФ}-каналов.

В группе животных, перенесших стресс на фоне предварительной адаптации («адаптация+стресс»), коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление не отличались от таковых, выявленных в сердцах

контрольных животных. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора S-MT не оказывало влияния на изменение коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда в группе животных «адаптация+стресс».

Коронароконстрикторный эффект глибенкламида и его эффект на развиваемое внутрижелудочковое давление также не отличались от контрольных показателей. В группе животных «адаптация+стресс» совместная блокада iNOS и K_{АТФ}-каналов сопровождалась увеличением коронарного перфузионного давления на 98% и уменьшением сократительной функции миокарда на 32% (табл. 5.8, 5.9). Таким образом, NO, синтезируемый iNOS, оказывает модулирующее влияние на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов, как гладкомышечных клеток коронарных сосудов, так и кардиомиоцитов, в группах «адаптация» и «адаптация+стресс».

Введение ТЭА в коронарное русло изолированных сердец крыс, подвергнутых иммобилизации, сопровождалось увеличением КПД на 68%, т.е. на 27% меньше, чем в контроле ($p < 0,05$, рис 5.7), РВД при этом не изменялось. Следовательно, стресс снижал эффективность действия ТЭА в отношении величины КПД, что может быть обусловлено снижением функциональной активности ВК_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

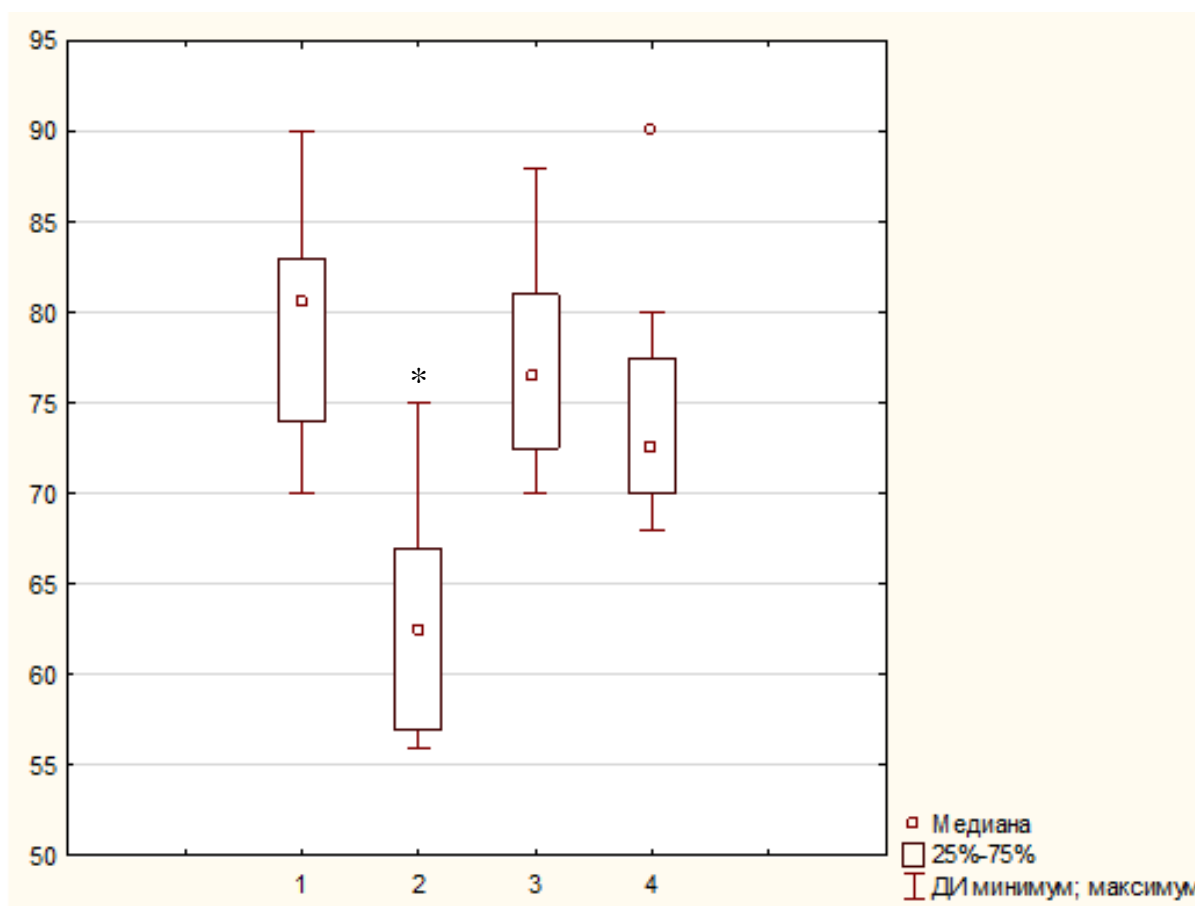


Рисунок 5.7. Влияние тетраэтиламмония на величину коронарного перфузионного давления у животных, перенесших стресс и адаптацию к коротким стрессорным воздействиям. Примечание: По оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль»; 2 – «Стресс»; 3 – «Адаптация»; 4 – «Адаптация+стресс»; по оси ординат – величина коронарного перфузионного давления в мм рт. ст.; [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал. * - $p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль»

В изолированных сердцах крыс группы «Стресс» на фоне блокады синтеза NO интракоронарное введение ТЭА увеличивало КПД на 88% (табл. 5.10), развиваемое внутрижелудочковое давление было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и VK_{Ca} -каналов (табл. 5.10).

Таким образом, продолжительный эмоционально-болевой стресс у крыс подавляет активность VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и создает выраженную зависимость их активности от функционирования iNOS.

В сердцах животных, адаптированных к стрессу, КПД и РВД не отличались от таковых в контроле (табл. 5.10). Добавление в перфузионный раствор S-MT не сопровождалось изменениями КПД и сократительной функции сердца, адаптированных к стрессу животных (табл. 5.10). Под влиянием ТЭА в группе животных «Адаптация» КПД увеличивалось на 98%, РВД не изменялось, и было выражено в той же степени, что и в контроле. Совместное интракоронарное введение S-MT и ТЭА сопровождалось увеличением КПД на 117% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и VK_{Ca} -каналов), сократительная функция миокарда при этом не изменялась. Следовательно, блокада iNOS увеличила функциональную активность VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу.

В группе животных «Адаптация+стресс», КПД и РВД не отличались от показателей, выявленных в сердцах контрольных животных. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора S-MT не оказывало влияния на изменение КПД и сократительной функции миокарда в группе животных «адаптация+стресс» (табл. 5.10). Добавление в перфузионный раствор ТЭА сопровождалось изменением КПД и РВД в равной степени, что и в контрольной группе животных (табл. 5.10). В группе животных «Адаптация+стресс» при совместной блокаде iNOS и VK_{Ca} -каналов наблюдалось увеличение КПД на 125% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и VK_{Ca} -каналов). В отношении сократительной функции миокарда коронароконстрикторный эффект ТЭА, был выражен в той же степени, что без добавления в перфузионный раствор блокатора S-MT. Исходя из вышеприведённых фактов можно заключить, что адаптация к стрессу предупредила постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, а также вызываемое стрессом снижение функциональной активности VK_{Ca} -каналов.

В наших исследованиях было установлено, что адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью предупредила вызванное иммобилизационным стрессом снижение эффективности действия гlibенкламида и тетраэтиламмония на тонус коронарных сосудов. После адаптации к коротким стрессорным воздействиям ингибируемая гlibенкламидом и тетраэтиламмонием функциональная активность K_{ATP} - и VK_{Ca} -каналов (соответственно) гладкомышечных клеток подавлялась. Однако в сердцах крыс, адаптированных к стрессу, блокада iNOS, приводила не только к восстановлению, но даже к повышению активности этих каналов. Вероятно, увеличенная продукция NO, характерная для адаптации [4], ограничивает активацию VK_{Ca} - и K_{ATP} -каналов, создавая выраженную зависимость активности данных каналов от NO, продуцируемого iNOS.

Таблица 5.10. Влияние стресса и адаптации на изменение коронарного перфузионного давления изолированного сердца крысы

Показатель	Группы экспериментальных животных и условия перфузии миокарда			
	Контроль без блокагора (n=8)	Стресс без блокагора (n=8)	Адаптация без блокагора (n=8)	Адаптация+стресс без блокагора (n=8)
Медиана, %	81,00	64,00	76,00	79,50
		$p_1 < 0,0009$		
Размах (Min-Max), %	75,00-95,00	55,00-69,00	69,00-86,00	72,00-86,00
95% ДИ для медианы, %	75,73-86,27	59,89-68,11	71,41-80,56	75,40-83,60
25-75 процентиль, %	77,50-85,00	59,00-65,50	74,50-80,25	75,75-80,00
	Контроль с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	87,00	81,00	80,50	80,50
		$P_2 < 0,0026$		
Размах (Min-Max), %	75,00-100,00	65,00-88,00	65,00-96,00	72,00-85,00
95% ДИ для медианы, %	79,63-94,37	75,14-86,86	69,73-91,27	76,86-84,14
25-75 процентиль, %	81,50-95,75	78,50-83,50	66,00-89,75	79,00-83,50
	Контроль с тетраэтиламмонием (n=8)	Стресс с тетраэтиламмонием (n=8)	Адаптация с тетраэтиламмонием (n=8)	Адаптация+стресс с тетраэтиламмонием (n=8)
Медиана, %	160,00	102,50	157,50	164,00
	$P_1 < 0,017$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,017; P_3 < 0,0014$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$
Размах (Min-Max), %	140,00-179,00	97,00-118,00	135,00-165,00	145,00-187,00
95% ДИ для медианы, %	151,01-168,99	96,11-108,89	148,50-166,49	152,55-175,45
25-75 процентиль, %	155,75-165,00	99,50-111,00	145,00-161,00	157,50-171,50
	Контроль с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Стресс с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=8)	Адаптация+стресс с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевойной (n=8)
Медиана, %	173,00	159,00	176,00	178,00
	$P_1 < 0,0015$	$P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$	$P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$
Размах (Min-Max), %	139,00-181,00	121,00-163,00	146,00-187,00	174,00-195,00
95% ДИ для медианы, %	158,56-187,44	146,66-171,34	162,68-189,32	172,16-183,84
25-75 процентиль, %	147,25-177,50	142,50-159,25	155,50-185,00	175,75-181,00

Примечание: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой животных без блокагора; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с той же группой, но без блокагора; $p_3 < 0,05$ – по сравнению с группой контроль, содержащей тетраэтиламмоний. n – количество животных в группе.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям так же, как и иммобилизация, сопровождается усилением продукции NO [4], увеличением экспрессии генов, ответственных за синтез iNOS, но, в отличие от стресса, умеренным накоплением фермента, неизменной системной активностью фермента eNOS и отсутствием системного воспаления низкой интенсивности. Возникает закономерный вопрос: почему при практически одинаковом увеличении экспрессии гена, ответственного за синтез iNOS, и гиперпродукции NO при стрессе и адаптации, при последней не возникает нарушения функциональной активности ВК_{Ca}- и К_{АТФ}-каналов? Характерный для начальных стадий адаптации окислительный стресс [6] может считаться стимулом, запускающим транскрипцию гена iNOS. Установлено, что супероксидный радикал при участии ядерного фактора транскрипции NF-κB способен активировать ген, ответственный за синтез iNOS. При этом увеличенная продукция NO по механизму отрицательной обратной связи ингибирует NF-κB [10], тем самым регулируя образование фермента iNOS. Кроме того, при умеренной продукции супероксидного радикала при участии ядерного фактора NF-κB активируются гены, ответственные за синтез супероксиддисмутазы, циклооксигеназы-2, HSP70 и других продуктов способных регулировать редокс-состояние клеток [25], тем самым изменяя их фенотипические свойства и предотвращая нарушение функции калиевых каналов при адаптации к стрессу. При адаптации к стрессу изменяется также доступность NO, вызванная образованием динитрозильных комплексов железа и S-нитрозотиолов, являющихся физиологически активным депо NO [1, 2] и предотвращающих его токсический эффект.

Мы установили, что адаптация к стрессу полностью предупреждает постстрессорное увеличение продукции NO, повышение активности фермента iNOS и развитие системного воспаления низкой интенсивности. В качестве одного из механизмов, лежащих в основе контроля постстрессорной активности iNOS, можно рассматривать формирование так называемых «аггросом» (aggresome) [31]. Формирование «аггросом, включающих белок iNOS» происходит в цитозоле, там же локализуется и iNOS. Образующийся NO оказывает прямое влияние на механизм сокращения миофиламентов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и кардиомиоцитов. Клетки, в которых iNOS располагается преимущественно в составе «аггросом», продуцируют NO в значительно меньших концентрациях. Таким образом, формирование аггросом в цитозоле можно рассматривать как механизм ограничения постстрессорной гиперпродукции NO индуцибельной NO-синтазой [31, 36].

Полученные экспериментальные данные позволяют констатировать, что активация iNOS в результате адаптации к стрессу, вероятно, играет важную роль в поддержании адекватной биодоступности NO, участвующего в механизмах локальной регуляции тонуса сосудов сердца. Усиленная продукция эндотелием NO (и, возможно, других веществ эндотелиального происхождения) по механизму обратной связи подавляет, но не нарушает базальную активность ВК_{Ca}- и К_{АТФ}-каналов гладкомышечных клеток. Следовательно, снижение активности К_{АТФ}-каналов на фоне повышенного образования NO индуцибельной NO-синтазой в условиях адаптации к стрессу создает условия для осуществления полноценного адаптационного ответа и является проявлением нормальных взаимоотношений систем локальной регуляции тонуса сосудов сердца. При этом скрытая активация К_{АТФ}-каналов при адаптации имеет биологическую целесообразность и может лежать в основе ограничения избыточного поступления внутрь сосудистых гладкомышечных клеток ионов кальция и предупреждения коронарораспазма при последующем стрессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1989. – Т. 63. – С. 924-938.
2. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе / Е.Б. Манухина и др. // Известия АН. Серия биологическая. – 2002. – Т. 5. – С. 585-596.
3. Манухина, Е.Б. Влияние экспериментального инфаркта миокарда и эмоционально-болевого стресса на эндотелийзависимые реакции изолированной аорты крысы / Е.Б. Манухина, А.В. Лапшин, Е.Е. Устинова, Ф.З. Меерсон // Физиол. ж. СССР им. И.М.Сеченова. – 1989. – Т. 75, № 10. – С. 1409-1416.
4. Манухина, Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, И.Ю.Малышев, Ю.В. Архипенко // Вестник РАМН. – 2000. – Т. 4. – С. 16-21
5. Манухина, Е.Б. Стресс-лимитирующая система оксида азота / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев // Росс. физиол. журнал им. И.М.Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 2. – Р. 1283-1292.
6. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М. Медицина. 1988.
7. Меерсон, Ф.З. Постстрессорная активация синтеза нуклеиновых кислот и белков и ее роль в адаптационных реакциях организма / Ф.З. Меерсон, В.И. Павлова, Г.Т. Сухих // Патол.физиол. и эксперим. терапия. – 1982. – Т. 5. – С. 3-17.
8. Новикова, Е. Б. Об ауторегуляции в коронарной системе / Е. Б. Новикова // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1972. – Т. 58, № 1. – С. 61-72.
9. An increase in opening of BK(Ca) channels in smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetic mice / C. Ye [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. – 2004. – Vol. 25, № 6. – P. 744–750.
10. Biphasic regulation of NF-kB activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide / L. Connelly [et al.] // J Immunol. – 2001. – Vol. 166. – P. 3873-3881.
11. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone / J. Ledoux [et al.] // Physiology. – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 69–78.
12. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia / T. Kuzuya [et al.] // Circ. Res. – 1993. – Vol. 72. – P. 1293–1299.
13. Diosmin Modulates the NF-kB Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy / S. Ahmed [et al.] // Inflammation. – 2016. – Vol. 39, № 5. – P. 1783-1797. doi: 10.1007/s10753-016-0413-4.
14. Direct activation of KCa channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism? / A. Abdelrrahmane [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 1998. – Vol. 19. – P. 485-497.
15. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia / L. Xi [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – Vol. 283. – P. H5-H12.
16. Gadek-Michalska, A. Chronic stress adaptation of the nitric oxide synthases and IL-1 β levels in brain structures and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity induced by homotypic stress / A. Gadek-Michalska, J. Tadeusz, P. Rachwalska, J. Bugajski // J Physiol Pharmacol. – 2015. – Vol. 66, № 3. – P. 427-440.
17. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model / N. Abu-Saleh [et al.] // Life Sci. – 2012. – Vol. 91. № 13-14. – P. 669-675.
18. Kane, G.C. ATP-Sensitive K- Channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits / G.C. Kane // Diabetes. – 2004. – Vol. 53, № 3. – P. S169-S175.

19. Kyle, D.B. The regulation of BK-channel activity by pre- and post-translational modifications / D.B. Kyle, A.P. Braun / *Frontiers in Physiology. Membrane Physiology and Membrane Biophysics*. – 2014. – Vol.5. – P. 1-10.
20. Lang, R.J. Sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate prevents S-nitroso-L-cysteine activation of Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeca / R.J. Lang, J.R. Harvey, E.L. Mulholland // *Br J Pharmacol*. – 2003. – Vol. 139. – P. 1153-1163.
21. Later phase cardioprotection of ischemic post-conditioning against ischemia/reperfusion injury depends on iNOS and PI3K-Akt pathway / G. Wang [et al.] // *Ann N Y Acad Sci*. – 2002. – Vol. 962. – P. 18-41.
22. Lazuko, S.S. Functional Activity of BKCa Channels in Coronary Vascular Smooth Muscle Cells during Combined Exposure to Hyperglycemia and Stress / S.S. Lazuko, A.P. Solodkov, S.S. Skrinaus // *Bull Exp Biol Med*. – 2014. – Vol. 156, №3. – P. 310-316.
23. Lui, C. H. Stoking Up BKCa Channels in Hemorrhagic Shock / C.H. Lui, N.O. Nelson // *Circulation Research*. – 2007. – Vol. 101. – P. 436-438.
24. Marber, M.S. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction / M.S. Marber, D.S. Latchman, J.M. Walker, D.M. Yellon // *Circulation*. – 1993. – Vol. 88. – P. 1264-1272.
25. Mercurio, F. NF- κ B as a primary regulator of the stress response / F. Mercurio, A. M Manning // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – P. 6163 – 6171.
26. Miyoshi, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K¹ channel of vascular smooth muscle cells / Miyoshi H., Nakaya Y., Moritoki H. // *FEBS Lett*. – 1994. – Vol. 345. – P. 47-49.
27. Naviaux, R.K. Metabolic features of the cell danger response / R.K. Naviaux // *Mitochondrion*. – 2014. – Vol. 16. – P. 7-17
28. Nelson, M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M.T. Nelson, J.M. Quayle // *Am. J. J.M. Physiol*. – 1995. – Vol. 37. – P. C799-C822.
29. Nitric oxide and cyclic-GMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cyclic-GMP-dependent protein kinase / S.L. Archer [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1994. – Vol. 91. P. 7583-7587
30. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia / I.Y. Malyshev [et al.] // *Nitric Oxide*. – 1999. – Vol. 3, № 2. P. 105-13.
31. Pandit, L. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS / L. Pandit, K.E. Kolodziejaska, S. Zeng, N.T. Eissa // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – Vol. 106, № 4. – 1211-1215.
32. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells / E. A. Ko [et al.] // *J. Smooth Muscle Res*. – 2008. – Vol. 44. № 2. – P. 65–81.
33. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney / C. M. Troncoso Brindeiro [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. – 2008. – Vol. 21. – P. 165–181
34. Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice / Suzuki Masashi [et al.] // *J. Clin. Invest*. – 2002. – Vol. 109. – P. 509–516.
35. Vascular ATP-dependent potassium channels, nitric oxide, and human forearm reactive hyperemia / A.J. Bank [et al.] // *Cardiovasc Drugs Ther*. – 2000. – Vol. 14, № 1. – P. 23–29.
36. Wang, T. Inducible nitric oxide synthase aggresome formation is mediated by nitric oxide / T. Wang, Y. Xia // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2012. – Vol. 426. – P. 386-389.
37. Wolin, M. Interactions of oxidants with vascular signaling systems / M. Wolin // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol*. – 2000. – Vol. 20. – P. 1430-1442.

38. Zeidner, G. Redox-dependent Gating of G Protein-coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels / G. Zeidner, R. Sadjia, E. Reuveny // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 38. – P. 3564-3570.

ГЛАВА 6

ВЕЩЕСТВА МОДУЛИРУЮЩИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ K_{ATP} - И VCa КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

Одним из патогенетических механизмов нарушения тонуса сосудов при сердечно-сосудистой патологии является дисфункция эндотелия, которая сопровождается, в частности, нарушением функциональной активности калиевых каналов, расположенных в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках сосудов. В последнее время для лечения сосудистых «катастроф» все большей популярностью пользуются такие вещества, как активаторы калиевых каналов. Одним из приоритетных направлений являются исследования, направленные на поиск веществ, способных оказывать модулирующее влияние на функцию эндотелия и калиевых каналов сосудов сердца.

Разработка антигипоксантов, а также данные о антигипоксических свойствах дибазола [8] послужили основой для поиска активных соединений в ряду бензимидазола и созданию веществ с той же функциональной группой, что и в аминотиолах, но в составе имидазольного ядра 2-тиомеркаптобензимидазола. Так, были синтезированы бемитил (этилтиоимидазол), алмид (аллилтиобензимидазол) и этомерзол (этилтиобензимидазола гидрохлорид). Эти препараты оказывают сходные с аминотиолами по характеру и выраженности эффекты при гипоксии [3]. На первых этапах экспериментального изучения бемитила внимание уделялось его способности сохранять физическую выносливость в осложненных ситуациях, благодаря его способности снижать потребление митохондриями кислорода, а также существенно ускорять восстановление дееспособности после предельных нагрузок, в стрессовых ситуациях, после отравления ФОС и т.д. [2, 14]. Благодаря механизмам действия, состоящих в быстроразвивающейся активации синтеза РНК, структурных и ферментативных белков в различных органах и тканях, стабилизации мембран и подавлению процессов свободнорадикального окисления, бемитил и его аналоги объединили в особый класс актопротекторов. Однако дальнейшие исследования актопротектора бемитила показали, что он характеризуется более широким спектром фармакологической активности. Бемитил способен воздействовать на κ -опиодные рецепторы и тем самым влиять на натриевые, кальциевые, калиевые ионные токи нейрональной мембраны за счет их непосредственного взаимодействия с канальными структурами [5]. Кроме того, уменьшает площадь ишемического повреждения сердца, стимулирует репаративные процессы в миокарде [4]. В основе последнего эффекта лежит его способность действовать подобно фармакологическому preconditionированию, активируя K_{ATP} -калиевые каналы [32]. Бемитил стимулирует цитохром P-450 [11] – фермент, стимуляция которого в эндотелиоцитах приводит к образованию эпоксиэйкозотриеновой кислоты (ЕЕТ), активирующей VCa -каналы гладкомышечных клеток. Бемитил имеет общие черты строения с NS1619 (также производное бензимидазола), являющийся золотым эталоном активаторов VCa -каналов гладкомышечных клеток. Кроме того, бемитил также как и дибазол относится к производным бензимидазола.

Дибазол – лекарственное средство, которое применяется в неотложной терапии при купировании гипертонических кризов, в педиатрии и иммунологии [9]. Он относится к группе миотропных спазмолитиков, общетонизирующих средств и адаптогенов. Лекарственное средство оказывает сосудорасширяющее, спазмолитическое, иммуностимулирующее действие. Непосредственно расслабляет гладкие мышцы кровеносных сосудов и внутренних органов. Иммуностимулирующая активность связана с регуляцией соотношения концентраций циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) и циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) в иммунных клетках (повышает содержание цГМФ), что приводит к пролиферации зрелых сенсibilизированных Т- и В-лимфоцитов, секреции ими факторов взаимного регулирования, кооперативной реакции и активации конечной эффекторной функции клеток. Внутриклеточный механизм расслабления

гладкомышечных клеток под влиянием дибазола не известен. Считается, что одной из возможных мишеней его действия является фосфодиэстераза – фермент, разрушающий циклические нуклеотиды, в частности, ц-ГМФ. Если учесть тот факт, что образование ц-ГМФ находится под контролем монооксида азота, образующегося в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, можно предположить, что одним из механизмов сосудорасширяющего действия дибазола может быть активация эндотелийзависимой опосредуемой монооксидом азота дилатации сосудов.

Все эти факты дают нам возможность предположить, что бемитил, как производное бензимидазола, может обладать способностью оказывать воздействие на эндотелийзависимую дилатацию и различные семейства калиевых каналов гладкомышечных клеток, и тем самым влиять на тонус артериальных сосудов. В данной работе в качестве производного бензимидазола использовалась субстанция, зарегистрированная Министерством здравоохранения республики Беларусь 2-этилтиобензимидазола гидробромид (регистрационное удостоверение №10/07/1767 выдано институту физико-органической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь).

6.1. Влияние монооксида азота на вазодилататорный эффект дибазола

Прямое вазорелаксирующее действие дибазола исследовали на 20 препаратах аорты крысы, которые предварительно сокращали фенилэфрином. Данную реакцию изучали до и после введения в перфузионный раствор блокатора синтеза монооксида азота L-NAME в концентрации 100мМ.

Предсокращение изолированного кольца аорты осуществляли стандартной дозой фенилэфрина (10^{-6} М). Дибазол добавляли в возрастающей концентрации от 10^{-11} до 10^{-4} М.

Животных разделяли на две группы: контрольную с интактной системой синтеза монооксида азота (n=10) и группу животных с заблокированным синтезом NO (n=10).

После 2-х часового периода стабилизации исходное напряжение в группе животных с интактной системой синтеза NO составляло 1951 ± 26 мг (табл. 4.1). Сократительный ответ кольца аорты на фенилэфрин в этой группе составил 1934 ± 144 мг. Добавление дибазола в раствор, омывающий кольца аорты контрольных животных от 10^{-10} до 10^{-4} М приводило к дозозависимому расслаблению кольца аорты. Причем отчетливый эффект дибазола наблюдался начиная с концентрации 5×10^{-6} М, максимальное расслабление составило более 90% от предварительного сокращения аорты фенилэфрином (рис. 4.1, табл. 4.1). Для сравнения, релаксирующий эффект ацетилхолина начинался при его концентрации в ванночке 10^{-9} М, а максимальная релаксация достигалась при 10^{-4} М и составляла 60%. Таким образом, кумулятивная концентрация дибазола в перфузионном растворе приводила к расслаблению кольца аорты крысы, этот эффект был выражен только при высоких концентрациях препарата. Это наводит на мысль о прямом влиянии дибазола на гладкомышечные клетки крупного сосуда. Релаксирующее же действие ацетилхолина реализуется посредством воздействия на эндотелиоциты. Оно связано с увеличением внутриэндотелиальной концентрацией ионов кальция и высвобождением NO и простагличина с последующим их воздействием на подлежащие гладкомышечные клетки.

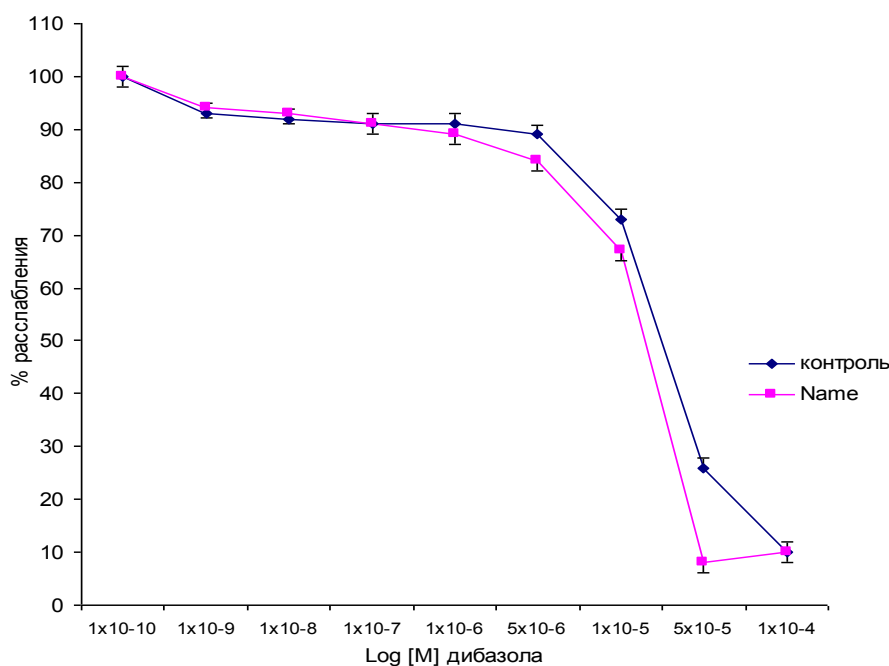


Рисунок 6.1. Зависимость вазорелаксирующего эффекта дибазола в условиях блокады синтеза монооксида азота. Примечание: по оси абсцисс – $\log [M]$ дибазола; по оси ординат - % расслабления

В изолированных кольцах группы животных с заблокированным синтезом монооксида азота исходное напряжение кольца аорты составляло 1933 ± 47 мг (табл. 6.1), что достоверно не отличалось от сегментов аорты группы животных с интактным синтезом монооксида азота. Сократительный ответ кольца аорты на фенилэфрин в этой группе составил 1800 ± 274 мг. Таким образом, исходные условия для действия дибазола были одинаковыми в исследуемых группах. Добавление в ванночку для перфузии дибазола на фоне блокады синтеза монооксида азота в концентрации от 10^{-10} до 10^{-4} М приводило к дозозависимому расслаблению кольца аорты, причем отчетливый эффект дибазола наблюдался начиная с концентрации 5×10^{-6} М максимальная релаксация составляла 95% от предварительного сокращения аорты фенилэфрином (рис. 6.1, табл. 6.1), что достоверно не отличалось от группы животных с интактной системой синтеза монооксида азота. Напротив, после блокады синтеза монооксида азота вызываемое ацетилхолином расслабление кольца аорты составляло лишь 19% от прироста его напряжения, вызванного фенилэфрином, а релаксирующий эффект NO, высвобождаемый под влиянием ацетилхолина, эффективно устранялся L-NAME (рис. 6.1, табл. 6.1).

Таким образом, с одной стороны, дибазол усиливает ацетилхолининдуцированное расслабление кольца аорты крысы, увеличивает чувствительность к ацетилхолину, а с другой, не зависит от состояния NO-синтазной системы.

Таблица 6.1. Влияние монооксида азота на вазодилаторный эффект дибазола

Группы животных	Исходное напряжение кольца, мг	Напряжение после предсокращения ФЭ ($10^{-6}M$), мг	Прирост напряжения, принимаемый за 100%, мг	Напряжение после введения дибазола в дозе (M) мг									
				1×10^{-10}	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}	
Контроль n=10	1951±26	3885±137	1934±144	3885±137	3753±125	3726±117	3710±116	3699±115	3609±105	3458±117	2400±117	2161±161	
L-NAME N=10	1933±47	3736±286	1804±274	3736±286	3635±282	3618±282	3605±285	3573±285	3112±197	3080±236	2025±125	2222±150	

Примечание - * $-p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных; n-количество животных в группе.

6.2. Влияние дибазола на эндотелийзависимую вазодилатацию изолированного кольца аорты в условиях блокады системы синтеза монооксида азота

Опыты проводили на 60 препаратах изолированного кольца аорты крыс (методика описана выше).

Состояние стимулируемой продукции монооксида азота эндотелием изолированного кольца аорты оценивали по величине реакции расслабления в ответ на кумулятивное введение в питательную жидкость ацетилхолина (от 10^{-11} до 10^{-4} М, Sigma, USA) на фоне предварительного сокращения, вызванного стандартной дозой фенилэфрина (10^{-6} М, Sigma, USA). Результат выражали как процент расслабления от величины сокращения, полученной после введения фенилэфрина.

Для выяснения роли K_{ATP} -калиевых каналов использовали блокатор глибенкламид (Sigma, USA). Глибенкламид растворяли в диметилсульфоксиде и вводили в термостатируемую ванночку за 15 минут до предсокращения фенилэфрином, так чтобы его конечная концентрация была равна 10 мкМ.

Для выяснения роли $ВК_{Ca}$ -каналов использовали блокатор данных каналов тетраэтиламмоний в концентрации 1 мМ (Sigma, USA).

Для определения влияния дибазола на эндотелийзависимое расслабление кольца аорты его добавляли в термостатируемую ванночку (концентрация 10^{-5} М) за 15 минут до предсокращения сегмента аорты фенилэфрином.

Для выяснения роли монооксида азота в эндотелийзависимом расслаблении кольца аорты использовали неселективный блокатор NO-синтазы метиловый эфир N-ω-нитро-L-аргинин (L-NAME, 1×10^{-4} М, Sigma, USA).

Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 10.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA). Цифровые данные представляли как $M \pm m$. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

Исходное напряжение изолированных колец аорты во всех исследуемых группах составляло от 1925 ± 81 до 2061 ± 31 мг. Под влиянием фенилэфрина (10^{-6} М) прирост напряжения сегмента аорты в контроле составлял 1500 ± 115 мг, что не отличалось от значений в исследуемых группах. Таким образом, исходные условия для действия ацетилхолина были одинаковыми.

Добавление в ванночку ацетилхолина (10^{-11} – 10^{-4} М) приводило к дозависимому расслаблению кольца аорты, предварительно сокращенного фенилэфрином. В контрольных изолированных кольцах аорты максимальная дилатация возникала при концентрации ацетилхолина в ванночке 10^{-5} М и составляла 60% от предварительного сокращения фенилэфрином. При добавлении в перфузионный раствор дибазола ацетилхолинзависимая дилатация достигала максимума при концентрации 10^{-5} М и составляла более 80% от прироста напряжения кольца, вызванного фенилэфрином (рис. 6.2). Концентрация ацетилхолина, вызывающая полумаксимальную дилатацию аорты (EC_{50}) в контроле, составляла $1,44 \times 10^{-7}$ М. После действия дибазола EC_{50} снижалась до $3,49 \times 10^{-9}$ М ($p < 0,05$, по сравнению с контролем).

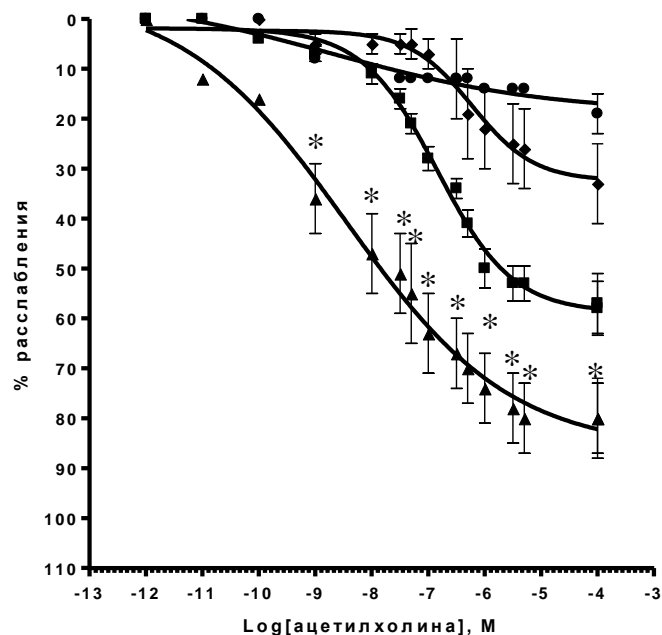


Рисунок 6.2. Влияние дибазола на NO-опосредуемую эндотелийзависимую вазодилатацию изолированного кольца аорты крыс в условиях блокады синтеза монооксида азота L-NAME. Примечание: по оси абсцисс – Log концентрации ацетилхолина, по оси ординат – % расслабления. ■ – группа контрольных животных; ▲ - дибазол; ◆- L-NAME+дибазол; ● - L-NAME *- $p < 0,05$, по сравнению с контролем

Таким образом, дибазол не только усиливал ацетилхолинзависимую дилатацию кольца аорты крысы, но и повышал чувствительность эндотелиоцитов к ацетилхолину.

Блокада синтеза монооксида азота L-NAME приводила к незначительному расслаблению кольца аорты, вызываемому ацетилхолином, что составляло 10% от прироста его напряжения, вызванного фенилэфрином (рис. 6.2). При этом чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к ацетилхолину снижалась $EC_{50} - 2,65310 \times 10^{-6}$ ($p < 0,05$, по сравнению с контролем ($EC_{50} - 1,44 \times 10^{-7} M$)).

При блокаде синтеза монооксида азота на фоне дибазола дилатация кольца аорты достигала максимума при концентрации ацетилхолина $10^{-5} M$, однако была выражена в большей степени, чем в группе животных с блокадой синтеза NO, но без добавления дибазола, и составляла 33% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем и группой «L-NAME») от прироста напряжения кольца, вызванного фенилэфрином (рис. 6.2). Следовательно, действие дибазола на ацетилхолинзависимое расслабление кольца аорты частично сохранялось и после блокады синтеза монооксида азота.

При сочетании дибазола и блокатора NO-синтазы L-NAME чувствительность гладких миоцитов изолированного сегмента аорты к ацетилхолину хотя и оставалась несколько ниже ($EC_{50} - 5,97 \times 10^{-7}$), чем в контроле с интактным синтезом NO ($EC_{50} - 1,44 \times 10^{-7} M$), однако увеличивалась по сравнению с группой животных с заблокированным синтезом монооксида азота ($EC_{50} - 2,65310 \times 10^{-6} M$, $p < 0,05$, табл. 6.2). Следовательно, под влиянием дибазола как в условиях интактной системы NO, так и заблокированной, чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к ацетилхолину оставалась более высокой по отношению к контролю.

Таблица 6.2 Влияние дибазола на концентрацию ацетилхолина, вызывающую полумаксимальную дилатацию кольца аорты

Группа животных	Вещества, добавляемые в перфузионный раствор	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М	Log EC ₅₀
Контроль (n=10)	-	$1,44 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7} - 1,58 \times 10^{-7}$	-6,840±0,010
Дибазол (n=8)	дибазол	$3,49 \times 10^{-9*}$	$2,56 - 4,76 \times 10^{-9}$	-8,457±0,060
L-NAME (n=7)	L-NAME	$1,55 \times 10^{-9*}$	$6,41 \times 10^{-10} - 3,75 \times 10^{-9}$	-8,809±0,010
Дибазол+ L-NAME (n=7)	дибазол, L-NAME	$5,96 \times 10^{-7}$	$2,90 \times 10^{-7} - 1,22 \times 10^{-6}$	-6,224±0,100

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

В связи с тем, что блокада синтеза монооксида азота не полностью устраняла вызываемое дибазолом усиление эндотелийзависимой дилатации изолированного кольца аорты, можно предположить, что дибазол усиливал не только высвобождение монооксида азота, но и действовал на другие механизмы вазорелаксации. Одним из таких механизмов может быть активация калиевых каналов гладкомышечных клеток аорты, возникающая вследствие как прямого на них влияния, так и опосредованного через воздействие эндотелиальных факторов гиперполяризации, высвобождающиеся под влиянием дибазола. В связи с этим, на следующем этапе мы определяли влияние дибазола на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов.

6.3. Влияние дибазола на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов в условиях блокады системы синтеза монооксида азота

После блокады K_{ATP}-каналов глибенкламидом вызываемая ацетилхолином релаксация, была больше, чем в контроле при концентрации ацетилхолина (10^{-6} М) и составляла 70% от предварительного предсокращения (рис. 6.3).

Обращает на себя внимание тот факт, что после блокады K_{ATP}-каналов EC₅₀ была достоверно меньше, чем в контроле и составляла $1,56 \times 10^{-8}$ М ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). Подобное явление может быть связано с тем, что после блокады K_{ATP}-каналов глибенкламидом увеличивалась чувствительность гладкомышечных клеток аорты к высвобождаемому эндотелием монооксиду азота. Таким образом, можно заключить, что глибенкламид, в равной степени, как и дибазол, усиливал индуцируемую ацетилхолином NO-зависимую релаксацию сегмента аорты.

Совместное воздействие дибазола и блокатора K_{ATP}-каналов глибенкламида приводило к снижению вазодилатации аортальных колец в ответ на действие ацетилхолина при его концентрациях $5 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ М в среднем на 20% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 6.3, табл. 6.3). При этом уменьшалась и чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к ацетилхолину по сравнению с контрольными показателями EC₅₀ – $9,21 \times 10^{-8}$ М (табл. 6.2).

При блокаде синтеза монооксида азота L-NAME и K_{ATP}-калиевых каналов глибенкламидом дилатация кольца аорты достигала максимума при концентрации ацетилхолина в ванночке 10^{-5} М – 42% (для сравнения, сочетание дибазола и L-NAME дилатация составила 33%, рис. 6.4, табл. 6.3), и была выражена в большей степени, чем в

группе животных с блокированной системой синтеза NO, но без добавления глибенкламида (10%) ($p < 0,05$, по сравнению с группой «L-NAME», табл. 6.3).

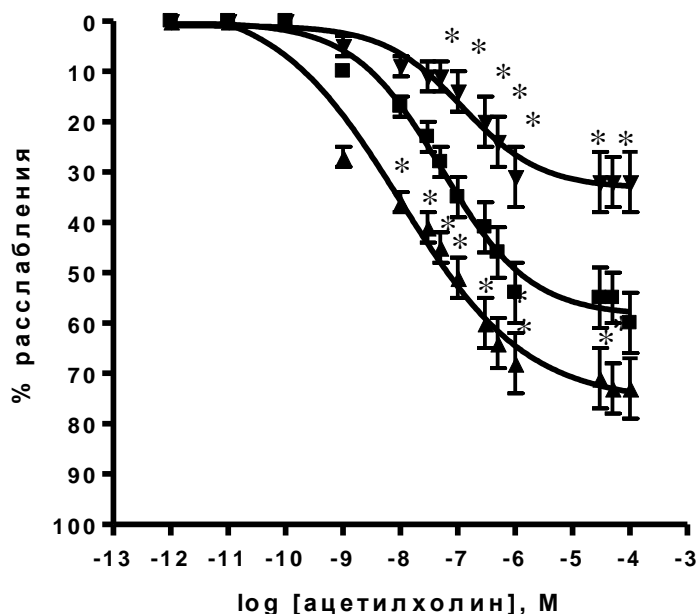


Рисунок 6.3. Влияние дибазола на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов. Примечание: по оси абсцисс – Log концентрации ацетилхолина, по оси ординат – % расслабления. ■-группа контрольных животных; ▲ - глибенкламид; ▼ - дибазол+глибенкламид; *- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных

Введение в перфузионный раствор дибазола, на фоне блокады K_{ATP} -калиевых каналов глибенкламидом и системы синтеза монооксида азота L-NAME сопровождалось эндотелийзависимой вазодилатацией, выраженной в той же степени, что и при действии только L-NAME и составляло в среднем 12% (рис. 6.4). Чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к ацетилхолину была выражена в той же степени, что и в контрольной группе животных, EC_{50} составляла $1,84 \times 10^{-7} M$ (табл. 6.2). Следовательно, дибазол устранял усиление эндотелийзависимой вазорелаксации кольца аорты, вызываемое глибенкламидом как с интактной системой синтеза монооксида азота, так и при ее блокаде.

Представленные данные свидетельствуют о том, что и дибазол, и глибенкламид, как в условиях интактной, так и блокированной системы синтеза NO демонстрируют повышение чувствительности гладкомышечных клеток артериальных сосудов к ацетилхолину. Можно предположить, что дибазол частично реализует свой эффект через активацию K_{ATP} -калиевых каналов, расположенных в гладких миоцитах артериальных сосудов.

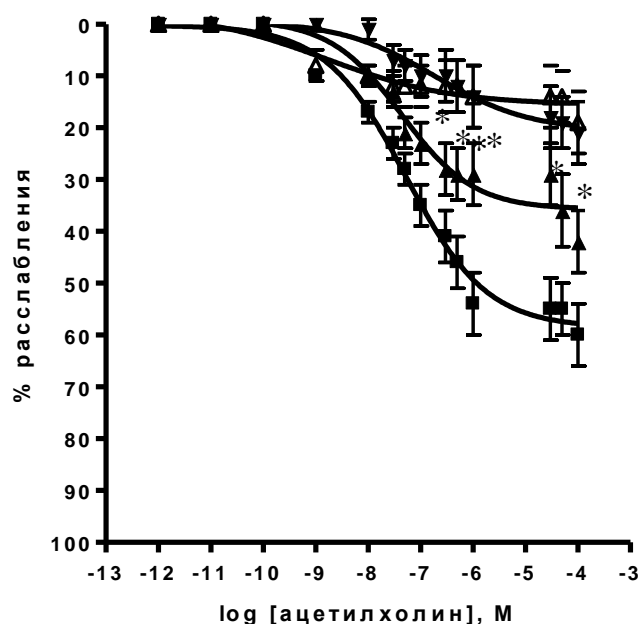


Рисунок 6.4. Влияние дибазола на функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов в условиях блокады синтеза монооксида азота L-NAME. Примечание: по оси абсцисс – Log[M] ацетилхолина, по оси ординат – % расслабления. ■ – группа контрольных животных; ▲ - L-NAME+глибенкламид; ▼ - L-NAME+дибазол+глибенкламид; Δ - L-NAME; * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных; # - $p < 0,05$ по сравнению с группой «L-NAME»

Таблица 6.3 Влияние дибазола на концентрацию ацетилхолина, вызывающую полумаксимальную дилатацию кольца аорты на фоне блокады АТФ-чувствительных калиевых каналов

Группа животных	Вещества, добавляемые в перфузионный раствор	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М	LogEC ₅₀
Контроль (n=10)	-	$1,44 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7} - 1,58 \times 10^{-7}$	$-6,84 \pm 0,010$
Глибенкламид (n=8)	Глибенкламид	$1,55 \times 10^{-8*}$	$9,62 \times 10^{-9} - 2,52 \times 10^{-8}$	$-7,80 \pm 0,010$
Глибенкламид+дибазол (n=6)	Глибенкламид+дибазол	$9,21 \times 10^{-8}$	$5,87 \times 10^{-8} - 1,44 \times 10^{-7}$	$-7,03 \pm 0,010$
Глибенкламид+L-NAME (n=7)	Глибенкламид+L-NAME	$4,33 \times 10^{-8*}$	$3,35 \times 10^{-8} - 5,60 \times 10^{-8}$	$-6,73 \pm 0,050$
Глибенкламид+L-NAME+дибазол (n=8)	Глибенкламид+L-NAME+дибазол	$1,84 \times 10^{-7}$	$1,42 \times 10^{-7} - 2,39 \times 10^{-7}$	$-6,73 \pm 0,050$

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

Таблица 6.3. Влияние дибазола на функциональную активность КАТФ-калиевых каналов кольца аорты крысы.

Группы животных	Исходное напряжение кольца, мВ	Напряжение после прекращения фенилэфрино м (10 ⁻⁶ М), мВ	Прирост напряжения, принимаемый за 100%, мВ	% расслабления после введения ацетилхолина в дозе (М) мВ										
				1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	3×10 ⁻⁸	5×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	3×10 ⁻⁷	5×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	3×10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁴
Контроль (n=10)	1970±50	3465±109	1500±115	4±0	11±1	16±1	21±2	28±2	34±2	41±2	50±3	53±3	53±3	58±5
глибенкламид +дибазол (n=6)	1925±81	2453±47	528±38	0	14±5	17±5	21±5	25±5	26±6	30±6	32±6	35±7	43±8	50±6
Глибенкламид (n=8)	2061±31	3467±187	1500±200	0*	27±8*	41±5*	45±5*	51±4*	60±3*	64±5*	68±4*	71±5*	73±5*	73±7*
L-NAME (n=7)	2064±27	3119±135	1055±140	8±1*	10±1	12±1*	12±1*	12±1*	12±1*	12±1*	14±1*	14±1*	14±1*	19±4*
Глибенкламид +L-NAME (n=7)	1743±30	2361±67	619±58	0*	10±3	13±4	21±6	23±7	28±10	29±10*	29±10*	29±10*	36±9*	42±7
глибенкламид +дибазол + L-NAME (n=8)	1695±61	2245±39	568±41	0*	1±0*	7±2*	8±2*	10±2*	10±2*	12±3*	14±2*	18±3*	19±3*	21±3*

Примечание -*p<0,05 по сравнению с контрольной группой животных; n-количество животных в группе. Цифровые данные представляли как M±m.

В результате проведенного исследования было установлено, что дибазол усиливает эндотелийзависимую вазодилатацию и увеличивает чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к высвобождаемому эндотелием монооксиду азота. Блокада синтеза монооксида азота L-NAME частично ограничивает, но полностью не предупреждает вазорелаксацию, вызываемую ацетилхолином в присутствии дибазола. Эти факты позволяют заключить, что дибазол модулирует функцию эндотелия через NO-зависимые механизмы и, вероятно, путем прямого (NO-независимая активация) действия на гладкомышечные клетки сосудов увеличивает образование растворимой гуанилатциклазы (pГЦ), что приводит к накоплению цГМФ. Последний активирует цГМФ-зависимые протеинкиназы, а также кальций зависимую АТФ-азу, участвующих в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выходу ионов кальция из мышечных волокон и в конечном итоге к вазодилатации [46].

Блокада К_{АТФ}-чувствительных калиевых каналов глибенкламидом в равной степени, как и дибазол, усиливает эндотелийзависимую вазодилатацию и увеличивает чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к высвобождаемому эндотелием монооксиду азота. Совместная блокада синтеза монооксида азота L-NAME и АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламидом частично ограничивает, но полностью не предупреждает вазорелаксацию, вызываемую ацетилхолином. Анализ литературы и собственных исследований показал, что глибенкламид, являясь блокатором К_{АТФ}-каналов, сам способен активировать NO-зависимый и NO-независимый механизмы активации цГМФ [45]. Эти данные наводят на мысль о том, что и дибазол, и глибенкламид имеют схожий механизм действия. Учитывая тот факт, что цГМФ – активный внутриклеточный посредник, регулирующий работу мембранных ионных каналов, процессы фосфорилирования белков (через протеинкиназы), активность фосфодиэстеразы, а также другие реакции, можно предположить, что дибазол через NO-зависимый механизм активации вторичного посредника цГМФ может модулировать активацию АТФ-чувствительных калиевых каналов. цГМФ-зависимые протеинкиназы способны фосфорилировать домены К_{АТФ}-калиевых каналов, тем самым способствуя вазо- и кардиопротекции [31, 32]. Мийоши с соавторами [34] продемонстрировали, что монооксид азота повышает активность АТФ-чувствительных калиевых каналов гладкомышечных клеток сосудов. Кроме того, известно о прямой активации митохондриальных К_{АТФ}-калиевых каналов экзогенным монооксидом азота. Активацию АТФ-чувствительного калиевого канала рассматривают как потенциальный механизм защиты миокарда в раннем и позднем ишемия-реперфузионном повреждении [16].

Совместное использование дибазола и блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламида приводит к снижению эндотелийзависимой вазодилатации в отличие от их раздельного воздействия. Этот факт объясняется тем, что при однонаправленном действии дибазола и глибенкламида, вероятно, наблюдается десенситизация растворимой гуанилатциклазы (p-ГЦ). Взятые вместе эти факты привели нас к предположению о том, что чувствительность системы растворимой гуанилатциклазы и накопление ц-ГМФ в гладкомышечных клетках, по-видимому, регулируется количеством воздействующего на нее NO. В случае гиперпродукции она значительно снижается и тем самым предупреждает избыточность или компенсирует недостаточность его вазодилаторного эффекта. Эти предположения согласуются с данными других исследователей. В частности, Deel E.D и соавторы в 2007 показали, что гиперэкспрессия конституциональной NO-синтазы снижает сосудорасширяющий эффект и чувствительность гладкомышечных клеток сосудов к монооксиду азота, вероятно, в результате изменения активности гуанилатциклазы [44]. Также известно, что длительное воздействие доноров NO на гладкомышечные клетки приводит даже к подавлению экспрессии генов, ответственных за синтез p-ГЦ [47]. Кроме того, пролонгированная экспозиция *in vitro* и *in vivo* сосудистой гладкой мышцы с донорами NO приводит к уменьшению ответной реакции на его последующее добавление [48].

6.4. Влияние дибазола на функциональную активность ВКС_а-каналов в условиях блокады системы синтеза монооксида азота

После блокады ВКС_а-каналов тетраэтиламмонием вызываемая ацетилхолином релаксация изолированного кольца аорты была меньше, чем в контроле и составляла 31% от предварительного предсокращения при концентрации ацетилхолина $5 \times 10^{-5} \text{ М}$ ($p < 0,05$) (рис. 6.5, табл. 6.4).

После блокады ВКС_а-каналов концентрация ацетилхолина, вызывающая полумаксимальный ответ аорты не изменялась. Так, EC_{50} в контроле равнялась $1,44 \times 10^{-7} \text{ М}$, после блокады ВКС_а-каналов тетраэтиламмонием EC_{50} составила $1,20 \times 10^{-7}$ – $1,2 \times 10^{-7} \text{ М}$.

Добавление в ванночку для перфузии дибазола на фоне блокады ВКС_а-каналов, ацетилхолинзависимая релаксация кольца аорты была выражена еще в меньшей степени по сравнению с группой животных на фоне блокады ВКС_а-каналов без дибазола и составила 15% ($p < 0,05$, рис. 6.5, табл. 6.4). Добавление в ванночку дибазола на фоне блокады кальцием активируемых калиевых каналов приводило к увеличению чувствительности эндотелия и составило $2,7523 \times 10^{-8} \text{ М}$ (для сравнения в контроле EC_{50} – $1,44 \times 10^{-7} \text{ М}$).

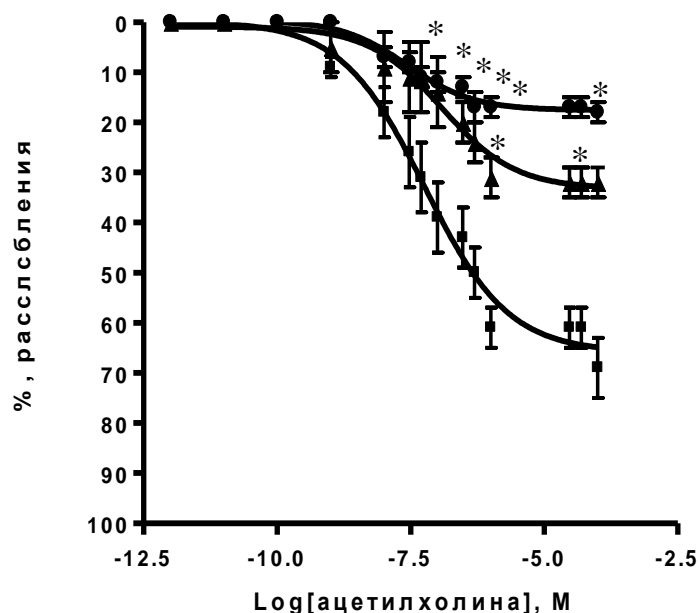


Рисунок 6.5. Влияние дибазола на функциональную активность ВКС_а-каналов. Примечание: по оси абсцисс – Log концентрации ацетилхолина, по оси ординат – % расслабления. ■ – группа контрольных животных; ▲ – тетраэтиламмоний; ● – тетраэтиламмоний+дибазол. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных

При блокаде синтеза монооксида азота L-NAME и ВКС_а-каналов тетраэтиламмонием дилатация кольца аорты достигала максимума при концентрации ацетилхолина в ванночке 10^{-4} М – 15%. После добавления в ванночку дибазола, тетраэтиламмония и L-NAME, ацетилхолинзависимая дилатация кольца аорты составила 14% (рис. 6.6, табл 6.4).

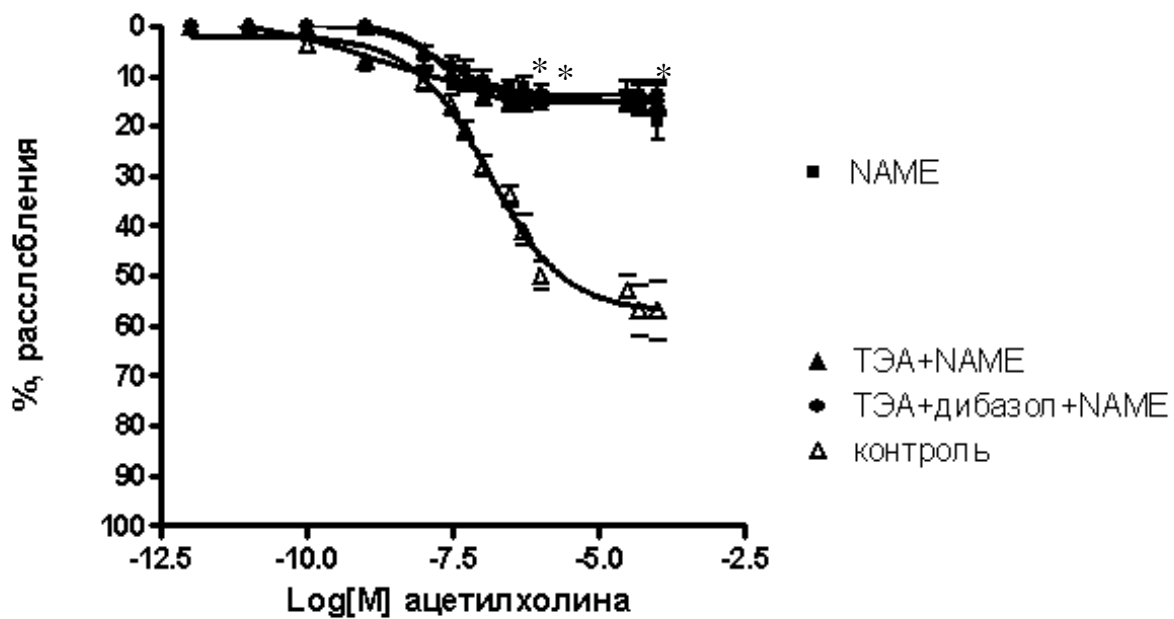


Рисунок 6.6. Влияние дибазола на функциональную активность BK_{Ca} -каналов в условиях блокады синтеза монооксида азота L-NAME. Примечание: по оси абсцисс – $\text{Log}[M]$ ацетилхолина, по оси ординат – % расслабления ; - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 6.4. Влияние дибазола на функциональную активность ВК_{Ca}-калиевых каналов кольца аорты крысы

Группы животных	Исходное напряжение кольца, мг	Напряжение после предсокращения фенилэфрино (10 ⁻⁶ M), мг	Прирост напряжения, принимаемый за 100%, мг	% расслабления после введения ацетилхолина в дозе (M) мг										
				1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	3×10 ⁻⁸	5×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	3×10 ⁻⁷	5×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	3×10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁴
Контроль (n=10)	1970±50	3465±109	1500±115	4±0	11±1	16±1	21±2	28±2	34±2	41±2	50±3	53±3	53±3	58±5
ТЭА +дибазол (n=6)	1935±15	2460±10	525±28	0*	0*	5±0*	5±0*	11±7*	12±6*	13±4*	14±4*	14±4*	15±4*	15±4*
ТЭА (n=8)	1876±45	3060±152	1184±137	0*	1±0*	2±0*	3±1*	4±1*	7±2*	13±1*	17±3*	25±5*	25±4*	31±6*
L-NAME (n=7)	2064±27	3119±135	1055±140	8±1*	10±1*	12±1*	12±1*	12±1*	12±1*	12±1*	14±1*	14±1*	14±1*	19±4*
ТЭА+ L-NAME (n=7)	1863±23	2543±47	680±38	0*	2±0*	3±1*	3±1*	5±2*	8±2*	12±1*	13±3*	14±3*	14±2*	15±3*
ТЭА+ дибазол+ L-NAME (n=8)	1880±57	2569±57	688±37	0*	0*	6±3*	8±3*	9±3*	11±3*	13±3*	13±3*	14±3*	14±3*	14±3*

Примечание -*p<0,05 по сравнению с контрольной группой животных; n- количество животных в группе. Цифровые данные представляли как M±m.

После блокады VK_{Ca} -каналов на фоне L-NAME EC_{50} снизилась и составляла $1,99 \times 10^{-8} \text{M}$, что свидетельствует о повышении чувствительности эндотелия к ацетилхолину (табл. 6.5). При добавлении в перфузионный раствор дибазола на фоне тетраэтиламмония и L-NAME EC_{50} оставалась такой же, как и в предыдущей группе составила $1,94 \times 10^{-8} \text{M}$ (табл. 6.5). Таким образом, блокада синтеза монооксида азота не вносила различий между группами в ацетилхолинзависимую дилатацию кольца аорты.

Таблица 6.5. Влияние дибазола на концентрацию ацетилхолина, вызывающую полумаксимальную дилатацию кольца аорты на фоне блокады VK_{Ca} -каналов

Группа животных	Вещества, добавляемые в перфузионный раствор	EC_{50} , М	CI 95% EC_{50} , М	Log EC_{50}
Контроль (n=10)	-	$1,44 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7} - 1,58 \times 10^{-7}$	$-6,84 \pm 0,010$
Тетраэтиламмоний (n=8)	Тетраэтиламмоний	$1,20 \times 10^{-7}$	$9,51 \times 10^{-8} - 10,51 \times 10^{-7}$	$-6,92 \pm 0,050$
Тетраэтиламмоний +дибазол (n=6)	Тетраэтиламмоний +дибазол	$2,75 \times 10^{-8*}$	$2,20 \times 10^{-8} - 3,42 \times 10^{-8}$	$-7,56 \pm 0,040$
L-NAME (n=7)	L-NAME	$1,55 \times 10^{-9*}$	$6,41 \times 10^{-10} - 3,75 \times 10^{-9}$	$-8,80 \pm 0,010$
Тетраэтиламмоний +L-NAME (n=7)	Тетраэтиламмоний +L-NAME	$1,99 \times 10^{-8*}$	$1,91 \times 10^{-8} - 2,08 \times 10^{-8}$	$-7,70 \pm 0,009$
Тетраэтиламмоний +L-NAME+ дибазол (n=8)	Тетраэтиламмоний +L-NAME+ дибазол	$1,94 \times 10^{-8*}$	$1,76 \times 10^{-8} - 2,13 \times 10^{-8}$	$-7,71 \pm 0,009$

Примечание -*: $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных; n- количество животных в группе.

В результате проведенного исследования было установлено, что дибазол усиливает эндотелийзависимую вазодилатацию и увеличивает чувствительность гладкомышечных клеток артериальных сосудов к высвобождаемому эндотелием монооксиду азота. Блокада синтеза монооксида азота L-NAME частично ограничивает, но полностью не предупреждает вазорелаксацию, вызываемую ацетилхолином в присутствии дибазола. Эти факты позволяют заключить, что дибазол модулирует функцию эндотелия через NO-зависимые механизмы и, вероятно, путем прямого (NO-независимая активация) действия на гладкомышечные клетки сосудов, увеличивает образование растворимой гуанилатциклазы (pГЦ), что приводит к накоплению цГМФ. Последний активирует цГМФ-зависимые протеинкиназы, а также кальций зависимую АТФ-азу, участвующих в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выходу ионов кальция из мышечных волокон и в конечном итоге к вазодилатации [39].

Блокада VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмонием приводила к уменьшению ацетилхолинзависимой NO-опосредуемой вазодилатации изолированного кольца аорты по сравнению с контрольной группой животных в 2 раза и составила 31%. Возможно, это связано с тем, что монооксид азота, синтезируемый эндотелием, частично опосредует свой эффект через активацию активируемых кальцием калиевых каналов. Однако механизмы прямой активации VK_{Ca} -каналы монооксидом азота до конца еще не ясны. Предполагают, что активация VK -каналов может быть связана с редокс реакцией, изменением конфигурации SH-групп цистеина и взаимодействием металла с белком гема.

Кальцием активируемые калиевые каналы играют важную роль в расслаблении гладкомышечных клеток сосудов. Открытие VK_{Ca} -каналов связано с увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция, что сопровождается выходом ионов калия из клетки и развитием гиперполяризации мембраны. Это приводит к закрытию

потенциалзависимых кальциевых каналов и расслаблению гладкомышечных клеток. Таким образом $ВК_{Ca}$ -каналы оказывают демпфирующий эффект на зависимость от деполяризации активацию кальциевых каналов, ограничивают количество входящих в клетку ионов кальция, что способствует ослаблению сократительной активности гладкомышечных клеток и, следовательно, снижению тонуса сосудов. Эндогенные сосудорасширяющие вещества могут изменять активность $ВК$ -каналов, действуя через $цГМФ$ -зависимые механизмы или через изменение частоты и амплитуды кальциевых «спарков» из саркоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток. $цГМФ$ -зависимые механизмы активации $ВК$ -каналов можно представить себе следующим образом: оксид азота, образовавшийся в ходе ферментативной реакции, проникает к гладкомышечным клеткам сосудов и активирует растворимую гуанилатциклазу ($рГЦ$). Активация $рГЦ$ влечет за собой ряд превращений, а именно превращает $ГТФ$ в $цГМФ$, последняя фосфорилирует $цГМФ$ -зависимую протеинкиназу G . Такая реакция сопровождается уменьшением концентрации ионов кальция внутри гладкомышечных клеток сосуда и как следствие, гиперполяризацией и их расслаблением.

При добавлении в перфузионный раствор дибазола на фоне блокады $ВК_{Ca}$ -каналов ацетилхолинзависимая вазодилатация уменьшилась дополнительно в 2 раза по сравнению с группой животных с ТЭА без дибазола и составила 15% (в группе животных с добавлением дибазола без ТЭА ацетилхолинзависимая вазодилатация составила 80%). Таким образом, можно предположить, что вазорелаксирующий эффект дибазола может быть частично обусловлен активацией $ВК_{Ca}$ -каналов, причем механизмы активации данных каналов дибазолом могут быть связаны либо с усилением высвобождения монооксида азота из эндотелия, либо с действием непосредственно на гладкую мышцу сосудов, увеличивая концентрацию $цГМФ$ и активируя $ВК_{Ca}$ -каналы гладкомышечных клеток, тем самым увеличивая ацетилхолинзависимую вазодилатацию.

На следующем этапе мы определили роль монооксида азота в реализации ацетилхолинзависимой вазодилатации на фоне блокады $ВК_{Ca}$ -каналов. В результате проведенных экспериментов было показано, что ацетилхолинзависимая вазодилатация на фоне блокады $ВК_{Ca}$ -каналов и синтеза монооксида азота была снижена в 2 раза по сравнению с группой животных с интактной системой монооксида после блокады $ВК_{Ca}$ -каналов, однако не отличалась от группы животных с блокированной системой синтеза монооксида азота и интактными $ВК_{Ca}$ -каналами. Это доказывает, что определяющую роль в ацетилхолинзависимой вазодилатации играет эндотелиальный монооксид азота, который реализует свой эффект частично через активацию $ВК_{Ca}$ -каналов.

При добавлении в перфузионный раствор дибазола на фоне блокады ТЭА $ВК_{Ca}$ -каналов и синтеза монооксида азота ацетилхолинзависимая вазодилатация составляла 15 %, что выражено в 2 раза слабее, чем в группе животных без ТЭА с дибазолом и блокадой синтеза монооксида азота. Таким образом, можно предположить, что дибазол оказывает свой эффект двумя путями. Во-первых, NO -зависимый механизм усиливает высвобождение монооксида азота из эндотелия. Во-вторых, NO -независимый механизм – непосредственно влияя на гладкомышечные клетки сосудов, активируя $ВК_{Ca}$ -каналы, возможно, через увеличение внутриклеточной концентрации $цГМФ$. Следовательно, возможно, дибазол, реализует свой эффект при интактной системе синтеза монооксида азота и высокой функциональной активности $ВК_{Ca}$ -каналов.

6.5. Влияние 2-этилтиобензимидазола гидробромида на выраженность дилатации сегмента аорты

исследование проведено на 49 белых нелинейных крысах-самках массой 180-220 г. Кольца аорты сокращались в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ)). Вазодилатацию оценивали классическим способом (предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином, 10^{-6} М) с

последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор одно из исследуемых веществ либо 2-этилтиобензимидазола гидро-бромид от 10^{-15} до 10^{-3} М, либо NS-1619 от 10^{-10} до 10^{-3} М. Для выяснения роли ВКСа-каналов в вазодилатации использовали блокатор тетраэтиламмоний (ТЭА). Была выбрана его концентрация 1 мМ, как избирательно блокирующая ВКСа-каналы [25]. Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 10.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA). Цифровые данные представляли как $M \pm m$. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

Исходное напряжение сегмента аорты в группах животных с интактным и удаленным эндотелием в присутствии и отсутствии блокатора ВКСа-каналов ТЭА составляло в среднем 1790 ± 48 мН и 1802 ± 52 мН соответственно. Сократительный ответ сегмента аорты на фенилэфрин не отличался между исследуемыми группами и составлял в среднем $3460 \pm 115,1$ мН. Таким образом, исходные условия для действия 2-этилтиобензимидазола гидробромида были одинаковые. Добавление в ванночку для перфузии 2-этилтиобензимидазола гидробромида в возрастающей концентрации приводило к дозозависимому расслаблению гладкой мышцы сегмента аорты крысы с интактным эндотелием. Дилатация начиналась при концентрации 2-этилтиобензимидазола гидробромида 10^{-9} М, при этом максимальная дилатация достигалась при концентрации исследуемого препарата 10^{-3} М и составляла 38% от прироста напряжения сегмента аорты, вызванного фенилэфрином. На фоне удаленного эндотелия вазодилатация изолированного сегмента аорты начиналась при концентрации ацетилхолина 10^{-8} М, достигала максимума при концентрации 10^{-3} М и составляла 22% от прироста напряжения сегмента, вызванного фенилэфрином (рис. 6.7).

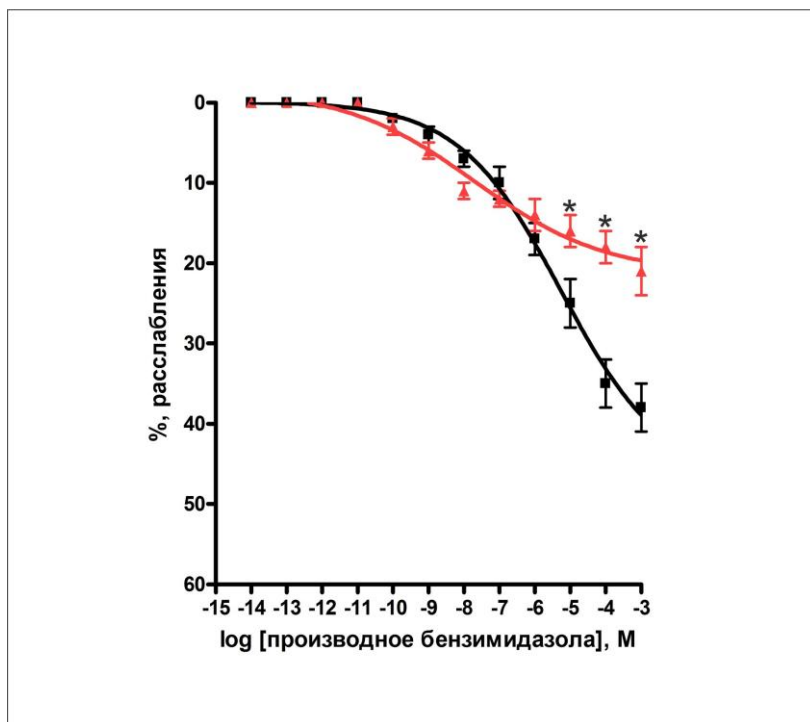


Рисунок 6.7. Влияние возрастающих концентраций 2-этилтиобензимидазола гидробромида на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия. Примечание: по оси абсцисс – log концентрации 2-этилтиобензимидазола гидробромида (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор 2-этилтиобензимидазола гидробромида. Цифровые данные представлены как $M \pm m$. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в условиях интактного эндотелия. ■ – группа животных с интактным эндотелием, ▲ – группа животных с удаленным эндотелием

Добавление в перфузионный раствор блокатора VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмония аннулировало вазорелаксирующий эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида как в условиях интактного, так и удаленного эндотелия (рис. 6.8). Таким образом, можно заключить, что вызванная 2-этилтиобензимидазолом гидробромидом вазодилатация изолированного сегмента аорты формируется за счет активации VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток сосуда.

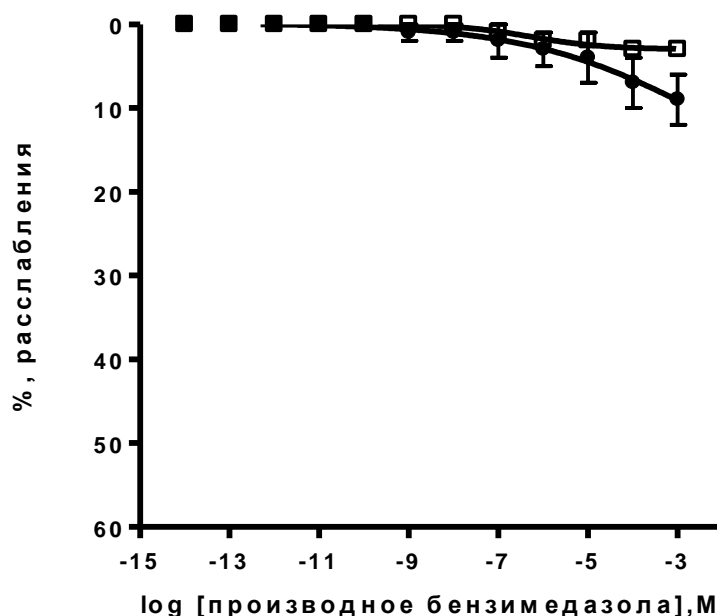


Рисунок 6.8. Влияние возрастающих концентраций 2-этилтиобензимидазола гидробромида на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия, в условиях блокады VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмонием. Примечание: по оси абсцисс – \log концентрации 2-этилтиобензимидазола гидробромида (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор 2-этилтиобензимидазола гидробромида. Цифровые данные представлены как $M \pm m$. ● – группа животных с удаленным эндотелием на фоне блокады VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмонием; □ – группа животных с интактным эндотелием на фоне блокады VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмонием

6.6. Влияние NS-1619 на выраженность дилатации сегмента аорты

Исходное напряжение сегмента аорты в группе животных с интактным эндотелием составляло в среднем 1860 ± 44 мН. В группе животных с интактным эндотелием прирост напряжения после введения в перфузионный раствор фенилэфрина составлял 3124 ± 38 мН. Под влиянием кумулятивного введения в ванночку активатора VK_{Ca} -каналов NS-1619 (10^{-8} – 10^{-3} М) релаксация сегмента аорты не наблюдалась. Так, при концентрации активатора в ванночке 10^{-3} М расслабление составляло всего лишь 8% от величины прироста, вызываемого введением фенилэфрина (рис. 6.9). Исходя из полученных данных, можно предположить, что действие активатора VK_{Ca} -каналов NS-1619 экранируется метаболитами эндотелиального происхождения, предположительно монооксидом азота (NO). Поэтому на следующем этапе эндотелий аккуратно удаляли хлопковой нитью путем однократного прокручивания ею по внутренней стенке подготовленного сегмента аорты. Исходное напряжение сегмента аорты с удаленным эндотелием контрольной группы животных и прирост в ответ на введение фенилэфрина были выражены в той же степени, что и в группе животных с интактным эндотелием. Возрастающие концентрации NS-1619 в сегментах аорты с удаленным эндотелием приводили к дозозависимому расслаблению. При концентрации NS-1619 в перфузионном растворе 10^{-3} М расслабление составляло

45%, что не отличалось от вазодилататорного эффекта 2-этилтиобензимидазола гидробромида (рис. 6.9).

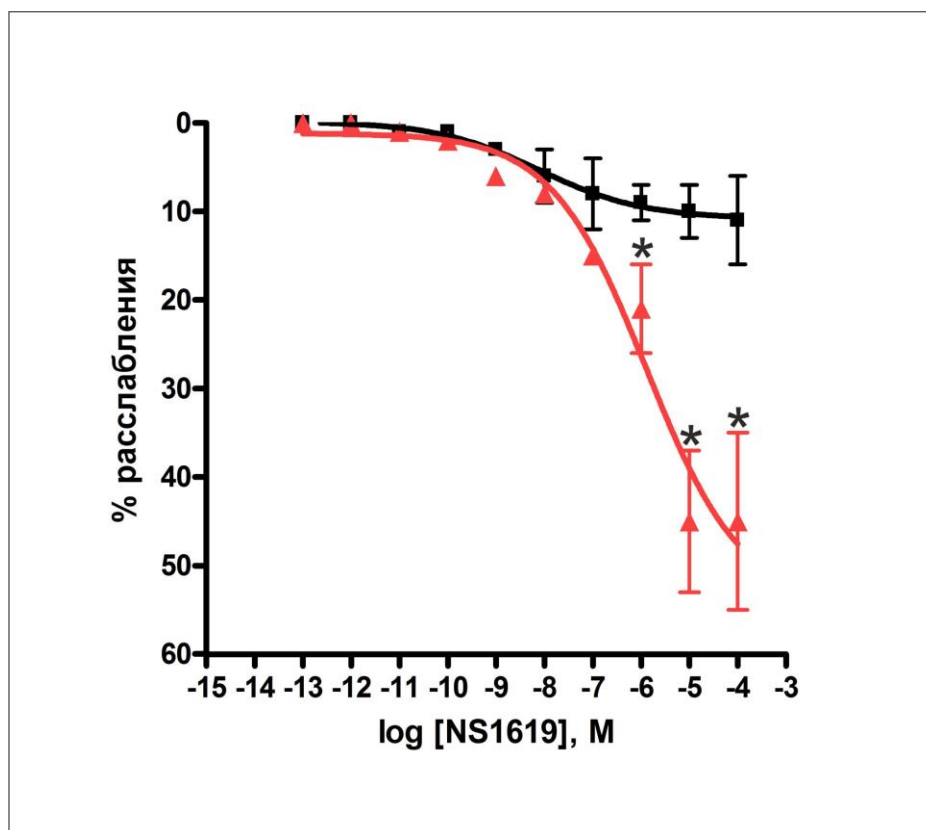


Рисунок 6.9. Влияние возрастающих концентраций NS1619 на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия. Примечание: по оси абсцисс – log концентрации NS1619 (M); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор NS1619. Цифровые данные представлены как $M \pm m$. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в условиях интактного эндотелия; ■ – группа животных с интактным эндотелием; ▲ – группа животных с удаленным эндотелием

Известны некоторые механизмы активации BK_{Ca} -каналов NS-1619. Во-первых, NS-1619 может непосредственно действовать на BK_{Ca} -калиевый канал, через рецепторы G-белка или за счет фосфорилирования субъединиц канала [24]. Во-вторых, активация канала NS-1619 является частично следствием ограниченного увеличения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , что влечет за собой активацию BK_{Ca} -каналов, увеличение выхода ионов калия и, как следствие, гиперполяризацию мембраны гладкомышечных клеток [24]. От того, что вызванное NS-1619 увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция активирует BK_{Ca} -каналы, но не вызывает сокращения клетки, может быть тот факт, что NS-1619 очень хорошо растворим в липидах и поэтому может избирательно распределиться в плазмолемме и субплазмолеммальных участках мембран, в том числе и кавеолах мембран. Этот пул Ca^{2+} представляет собой так называемый «несократительный компартмент», так как депонированный в мембране Ca^{2+} не участвует в генерации сокращения, а выполняет другие внутриклеточные функции. Кроме того, NS-1619 также ингибирует потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, потенциал-зависимые K^{+} -каналы, K_{ATP} -калиевые каналы. Подобные свойства активаторов BK_{Ca} -каналов позволяют предполагать возможность применения селективных активаторов BK_{Ca} -каналов для лечения и профилактики сердечно-сосудистых

заболеваний. Впервые в работе показано, что 2-этил-тиобензимидазола гидробромид оказывает вазодилататорный эффект через активацию $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток. Обращает на себя внимание и тот факт, что действие 2-этилтиобензимидазола гидробромид на калиевые каналы реализуется в присутствии эндотелия сосудов и частично в денудированных сосудах. Напротив, NS1619 реализует свой эффект только в отсутствии эндотелия. Этот факт наводит на мысль о том, что действие исследуемого вещества реализуется через иные механизмы, отличные от механизма действия NS1619, и требует дальнейшего изучения. Выявленное действие 2-этилтиобензимидазола гидробромид на калиевые каналы гладкомышечных клеток артериальных сосудов позволит применять его не только как препарат для коррекции гомеостаза организма в условиях воздействия экстремальных факторов различного генеза, но и как средство, вызывающее дилатацию артериальных сосудов через активацию $ВК_{Ca}$ -каналов, в частности, для профилактики и лечения артериальной гипертензии. Лекарственные препараты, изготовленные на основе отечественного 2-этилтиобензимидазола гидробромид, могут быть значительно дешевле зарубежных аналогов.

6.7. Возможность профилактики стрессорных изменений коронарного кровообращения и сократительной функции миокарда зависит от состояния функциональной активности K_{ATP} -каналов

В опытах на сердце крысы, изолированном по методу Лангендорфа, в условиях постоянного давления (методика писана выше). Определяли величины объемной скорости коронарного потока (коронарный поток), индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический коронарный поток, коронарный расширительный резерв, а также оценивали сократительную активность миокарда и интенсивность перфузии. Каждый опыт состоял из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелейта, на втором – этим же раствором, но с добавлением одного из ингибиторов. Таким образом, контрольные и экспериментальные данные были получены на одном и том же сердце.

Каждый эксперимент состоял из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелейта, содержащим растворитель в концентрации 0,05% (V/V). На втором этапе перфузировали таким же раствором, но с добавлением ингибитора K_{ATP} -каналов глибенкламида (10 мкМ). Вклад K_{ATP} -каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта глибенкламида, выраженного в процентах от исходного кровотока.

Стресс вызывали фиксацией животных на предметном столике в течение 6 ч. После этого их выпускали в клетку и через 1.5 часа брали в эксперимент. Адаптацию к стрессу проводили путем двух 3-дневных циклов иммобилизации по следующей схеме: крысу помещали в пластиковый пенал и погружали в воду с температурой (22°C) до уровня шеи: 1-й день - 5 мин., 2 - й день - 10 мин., 3 - й день - 15 мин. После 2-х дневного перерыва адаптацию повторяли. Глибенкламид в дозе 10мг/кг начинали вводить внутрибрюшинно за сутки до первого сеанса адаптации и продолжали на протяжении всех 8 дней ее создания. Пинацидил (0,3 мкг/кг внутрибрюшинно) вводили в течение 3-4-х дней до стресса. Через сутки после последней инъекции воспроизводили 6-часовой иммобилизационный стресс.

Все животные были разделены на 6 групп: группа 1-ая – контрольная (n=9), группа 2-ая группа крыс - перенесшие 6-часовой иммобилизационный стресс (n=9), 3-ья – животные, которым до иммобилизации вводили пинацидил (n=6), 4-ая – группа крыс в течение 3-4-х дней внутрибрюшинно получала пинацидил (n=9), 5-ая - адаптированные и подвергнутые 6-часовой иммобилизации животные, которым одновременно с сеансами адаптации внутрибрюшинно вводили растворитель (диметилсульфоксид в объеме 0,1

мл) (n=9), 6-ая – перенесшие иммобилизационный стресс после предварительной адаптации, воссозданной на фоне внутрибрюшинного введения глибенкламида (n=7).

Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 10.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA). Цифровые данные представляли как $M \pm m$. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

В изолированных сердцах крыс, которым внутрибрюшинно вводили глибенкламид на протяжении адаптации, иммобилизационный стресс вызывал увеличение объемной скорости коронарного потока при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 40% по сравнению с контролем, (для сравнения при стрессе вызываемого у неадаптированных крыс на 15-29% в диапазоне перфузионного давления 80-120 мм рт.ст.), и на 21% по сравнению с группой животных «адаптация+стресс», которым внутрибрюшинно в процессе адаптации вводили растворитель (рис. 6.10). Индекс ауторегуляции уменьшался на 29-35% при перфузионном давлении от 80 до 120 мм рт.ст. по сравнению с контролем. Максимальный гиперемический коронарный поток, определяемый при перфузионном давлении 80-120 мм рт.ст. увеличивался на 33% ($p < 0,05$) – 18% соответственно по сравнению с контролем, а коронарный расширительный резерв снижался при перфузионном давлении 120 мм рт.ст. на 20% из-за возрастания исходной объемной скорости коронарного потока (при стрессе на 10%, а группе адаптация+стресс с предварительным введением диметилсульфоксида коронарный расширительный резерв не отличался от контроля).

Внутрибрюшинное введение блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов в группе животных «адаптация+стресс» сопровождалось увеличением интенсивности перфузии при перфузионном давлении 40, 80, 120 мм рт.ст. на 29, 50, 46% соответственно, что свидетельствовало о развитии явления гиперперфузии миокарда, вызванной пострессорным нарушением способности коронарных сосудов к ауторегуляции (табл. 6.6). Под влиянием иммобилизации у адаптированных на фоне внутрибрюшинного введения глибенкламида животных развиваемое внутрижелудочковое давление, как и при стрессе, снижалось в среднем на 13% при всех уровнях перфузионного давления по сравнению с контролем и на 17% с группой «адаптация +стресс+DMSO», а интенсивность перфузии увеличилась на 29, 50 и 46% при перфузионном давлении 40, 80 и 100 мм рт.ст. соответственно (табл. 6.6). Следовательно, ингибирование функциональной активности K_{ATP} -каналов глибенкламидом нарушила развитие защитного антистрессорного эффекта коротких стрессорных воздействий в коронарных сосудах и миокарде.

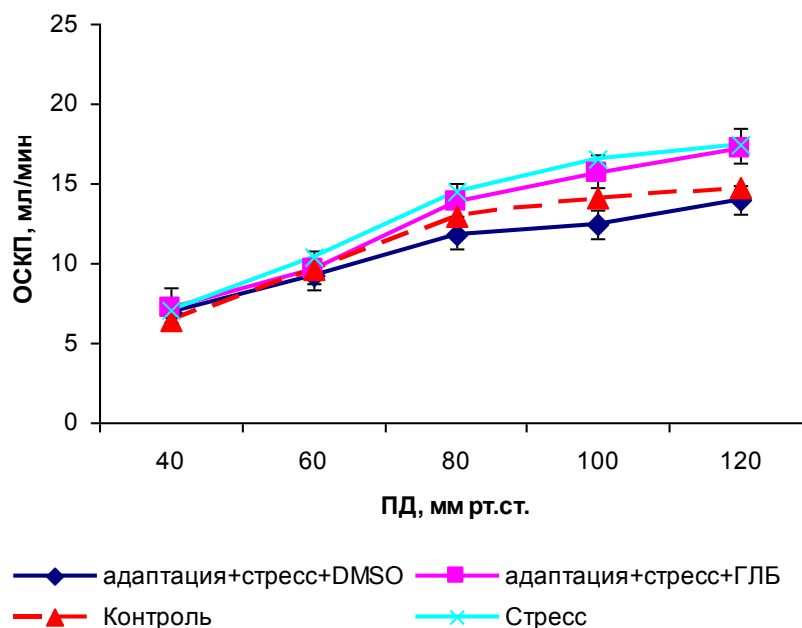


Рисунок 6.10. Изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в группе адаптированных животных перенесших иммобилизацию на фоне внутрибрюшинного введения ГЛБ. По оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока в мл/мин. -* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Введение в коронарное русло изолированного сердца адаптированных и перенесших стресс крыс (предварительное внутрибрюшинное введение блокатора K_{ATP} -каналов) глибенкламида, сопровождалось, снижением объемной скорости коронарного потока в среднем на 29,8% (для сравнения в контроле на 40%, рис. 6.11, А) и увеличением индекса ауторегуляции при перфузионном давлении 60, 80 и 120 мм рт.ст. на 45, 22 и 23% соответственно (табл. 6.6). Под влиянием глибенкламида максимальный гиперемический коронарный поток уменьшался в той же степени, как и после иммобилизационного стресса на 25-23%, что было почти в 2 раза меньше, чем в контроле (на 45-55%) (для сравнения при стрессе на 24-28%, ($p < 0,05$; рис. 6.11, Б). Развиваемое внутрижелудочковое давление снижалось в среднем на 17% (при стрессе на 14%, рис. 6.11, В), а коронарный расширительный резерв, как и в контроле не изменялся.

Таблица 6.6. Влияние внутрибрюшинного введения глибенкламида на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии у адаптированных к коротким стрессорным воздействиям крыс

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Объемная скорость коронарного потока, мл/мин	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	5,6±0,1	7,5±0,2	9,7±0,4	10,1±0,3	11,5±0,3
	Стресс 6ч (n=9)	с глибенкламидом	3,4±0,2*	3,9±0,2*	5,7±0,2*	5,9±0,2*	6,1±0,3*
		без глибенкламида	7,1±0,1	10,4±0,3	14,5±0,7	16,5±0,8	17,5±0,1
		с глибенкламидом	4,6±0,13**	6,7±0,12**	9,7±0,55**	10,7±0,75**	12,7±0,41**
	Адаптация+стресс (в/б введение DMSO) (n=7)	без глибенкламида	5,9±0,3	8,8±0,3	11,5±0,5	11,9±0,5	13,5±0,6
		с глибенкламидом	4,2±1,21*	5,8±0,34*	7,1±0,70*	7,8±1,12*	8,8±1,15*
Индекс ауторегуляции	Адаптация+стресс (в/б введение глибенкламида) (n=7)	без глибенкламида	7,1±0,50#	9,6±0,80#	13,8±0,51#	15,6±0,63#	17,2±1,00#
		с глибенкламидом	5,2±0,44*	6,3±0,48*	9,5±0,54*	11,0±1,08*	12,3±1,62*
	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	0,33±0,04	0,41±0,05	0,80±0,06	0,79±0,02
		с глибенкламидом	-	0,74±0,01*	0,80±0,08*	0,89±0,06	0,90±0,07
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	-	0,35±0,40	0,34±0,03	0,49±0,11	0,37±0,06
		с глибенкламидом	-	0,38±0,03	0,41±0,05*	0,72±0,09*	0,57±0,14
	Адаптация+стресс (в/б введение DMSO) (n=7)	без глибенкламида	-	0,50±0,09	0,52±0,09	0,82±0,07	0,50±0,16
		с глибенкламидом	-	0,45±0,06*	0,80±0,09*	0,75±0,07	0,54±0,16
	Адаптация+стресс (в/б введение ГЛБ) (n=7)	без глибенкламида	-	0,34±0,08	0,29±0,07#	0,52±0,10#	0,52±0,15#
		с глибенкламидом	-	0,62±0,13*	0,37±0,09*	0,53±0,15	0,68±0,10*

Продолжение таблицы 6.6

Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	-	13,4±0,58	-	18,6±0,91
	Стресс 6ч (n=9)	с глибенкламидом	-	-	7,3±0,36*	-	8,6±0,36*
	Адаптация+стресс (в/б введение DMSO) (n=7)	без глибенкламида	-	-	17,5±0,3 [#]	-	24,2±1,4 [#]
		с глибенкламидом	-	-	13,2±0,8*	-	17,4±0,9*
	Адаптация+стресс (в/б введение глибенкламида) (n=7)	без глибенкламида	-	-	15,7±0,60	-	20,1±0,91
		с глибенкламидом	-	-	9,7±0,74*	-	13,5±1,40*
	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	-	17,8±0,83 [#]	-	22,1±0,91
		с глибенкламидом	-	-	13,4±0,90*	-	16,9±1,21*
Коронарный расширительный резерв	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	-	-	1,42±0,02	-	1,80±0,03
		с глибенкламидом	-	-	1,65±0,06	-	1,63±0,02
	Адаптация+стресс (в/б введение DMSO) (n=7)	без глибенкламида	-	-	1,30±0,03 [#]	-	1,38±0,05 [#]
		с глибенкламидом	-	-	1,34±0,01	-	1,38±0,07
	Адаптация+стресс (в/б введение глибенкламида) (n=7)	без глибенкламида	-	-	1,36±0,03	-	1,64±0,04
		с глибенкламидом	-	-	1,54±0,16	-	1,58±0,14
	Адаптация+стресс (в/б введение глибенкламида) (n=7)	без глибенкламида	-	-	1,34±0,03	-	1,29±0,05
		с глибенкламидом	-	-	1,57±0,05	-	1,41±0,09

Продолжение таблицы 6.6

Внутрижелудочковое давление, мм рт.ст.	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	58,0±2,92	85,0±5,36	105,0±5,31	108,0±6,94	110,0±5,13
		с глибенкламидом	40,0±4,23	63,0±4,37*	73,0±5,37*	78,0±6,57*	79,0±3,24*
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	47,0±4,6	72,0±3,9	94,6±3,7	110,3±3,9	117,0±6,2
		с глибенкламидом	42,3±2,5	62,3±3,2*	79,0±1,6*	89,0±3,2*	95,6±6,2*
	Адаптация+стресс введение DMSO (n=7)	без глибенкламида	69,0±2,2#	98,0±5,2#	114,0±3,0	123,0±1,6	126,0±1,2#
		с глибенкламидом	52,0±1,5*	65,0±4,6*	83,0±4,3*	87,0±5,3*	88,0±5,7*
	Адаптация+стресс введение глибенкламида (n=7)	без глибенкламида	48,0±5,6	74,0±4,1	95,0±4,1	110,0±5,0	118,0±7,6
		с глибенкламидом	41,0±2,4*	59,0±3,9**	82,0±1,6**	89,0±3,8**	97,0±7,4*
Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	0,41±0,02	0,44±0,04	0,28±0,01	0,26±0,02	0,37±0,03
		с глибенкламидом	0,49±0,07	0,51±0,04	0,27±0,02	0,28±0,03	0,44±0,04
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	0,50±0,05	0,50±0,03	0,50±0,03#	0,40±0,03#	0,40±0,02
		с глибенкламидом	0,50±0,02	0,40±0,01	0,36±0,02	0,33±0,03	0,36±0,03
	Адаптация+стресс введение DMSO (n=7)	без глибенкламида	0,39±0,06	0,40±0,06	0,42±0,03#	0,38±0,02#	0,39±0,01
		с глибенкламидом	0,37±0,03	0,38±0,05	0,33±0,04	0,20±0,07	0,20±0,07
	Адаптация+стресс введение глибенкламида (n=7)	без глибенкламида	0,53±0,02#	0,42±0,03	0,42±0,02#	0,38±0,02#	0,41±0,02
		с глибенкламидом	0,44±0,05	0,36±0,04	0,39±0,06	0,40±0,9	0,40±0,10

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с данными, полученными при перфузии изолированного сердца данной группы раствором Кребса-Хензелята, не содержащим глибенкламид; # - по сравнению с группой контроля, не содержащей глибенкламид; n-количество животных в группе; DMSO- диметилсульфоксид.

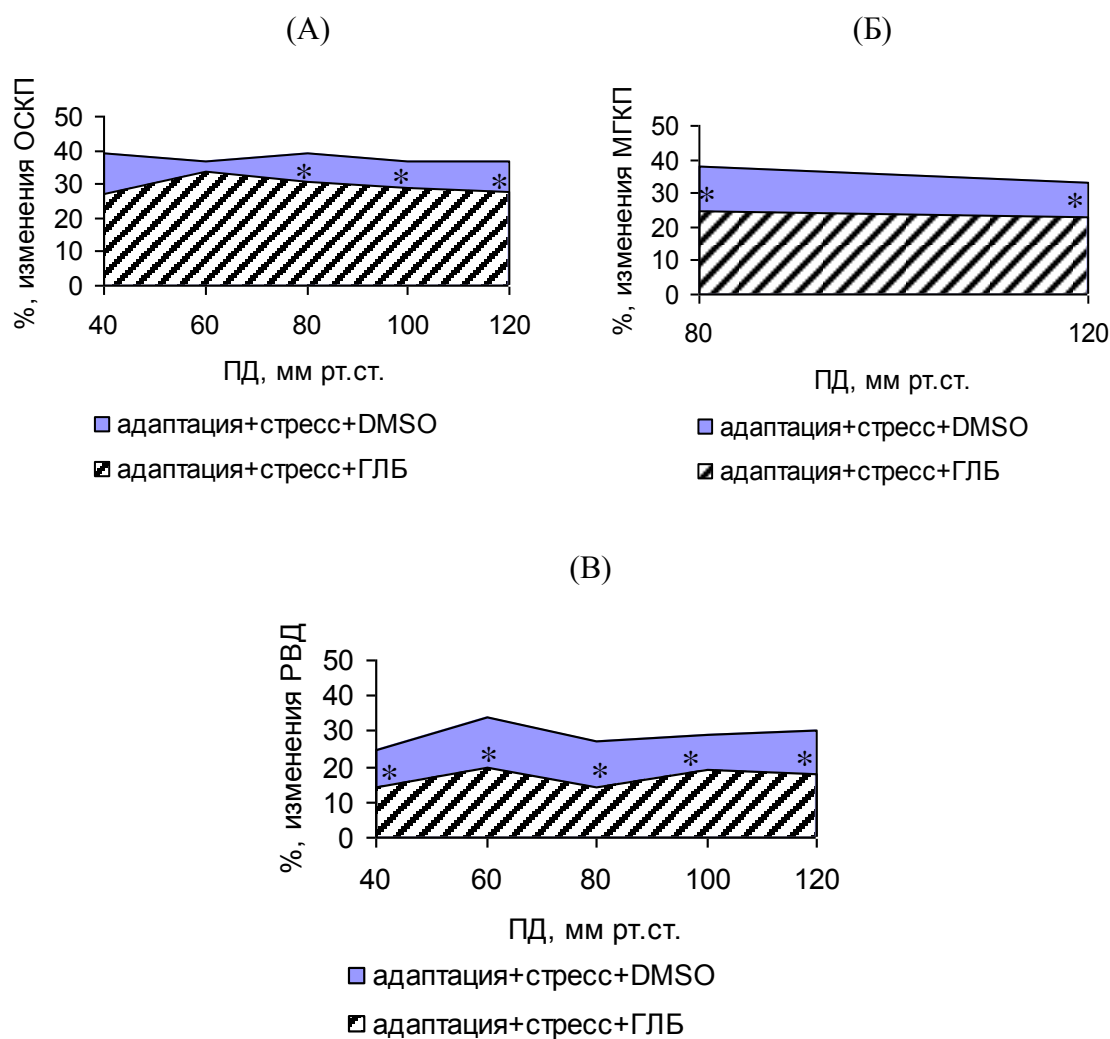


Рисунок 6.11. Влияние внутрибрюшинного введения глибенкламида на изменения объемной скорости коронарного потока (А), максимального гиперемического коронарного потока (Б) и развиваемого внутрижелудочкового давления (В) у животных перенесших стресс после предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям. По оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – % изменения. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой адаптация+стресс +DMSO

Предварительное внутрибрюшинное введение пинацидила, в контрольной группе животных не приводило к изменению объемной скорости коронарного потока (рис. 6.12), индекса ауторегуляции, максимального гиперемического потока, коронарного расширительного резерва и развиваемого внутрижелудочкового давления (табл. 6.7).

В группе животных перенесших стресс после предварительного внутрибрюшинного введения пинацидила объемная скорость коронарного потока, индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический коронарный поток, коронарный резерв и развиваемое внутрижелудочковое давление так же не отличалась от контроля. Следовательно, предварительное введение пинацидила не оказывая влияния на показатели коронарной ауторегуляции, в значительной степени ограничила постстрессорное снижение тонуса сосудов сердца, и предупредило снижение сократительной функции миокарда.

Таблица 6.7. Влияние внутривенного введения пинацидила на индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв, сократительную функцию миокарда и интенсивность перфузии у крыс, перенесших 6-часовую иммобилизацию

Показатель	Группа животных	Условие перфузии	Перфузионное давление, мм рт. ст.				
			40	60	80	100	120
Объемная скорость коронарного потока, мл/мин	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	5,6±0,1	7,5±0,2	9,7±0,4	10,1±0,3	11,5±0,3
		с глибенкламидом	3,4±0,2*	3,9±0,2*	5,7±0,2*	5,9±0,2*	6,1±0,3*
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	7,1±0,1	10,4±0,3	14,5±0,7	16,5±0,8	17,5±0,1
		с глибенкламидом	4,6±0,13**	6,7±0,12**	9,7±0,55**	10,7±0,75**	12,7±0,41**
	Контроль (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	5,3±0,17	7,1±0,40	8,8±0,59	10,1±0,81	10,6±0,80
		с глибенкламидом	2,7±0,24**	3,6±0,37**	4,4±0,36**	4,6±0,29**	4,9±0,39**
	Стресс (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	5,5±0,12	7,4±0,24	10,1±0,34	11,5±0,61	12,7±0,58
		с глибенкламидом	3,1±0,15**	4,9±0,15**	6,3±0,17**	6,6±0,40**	6,9±0,40**
Индекс ауторегуляции	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	0,33±0,04	0,41±0,05	0,80±0,06	0,79±0,02
		с глибенкламидом	-	0,74±0,01*	0,80±0,08*	0,89±0,06	0,90±0,07
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	-	0,35±0,40	0,34±0,03	0,49±0,11	0,37±0,06
		с глибенкламидом	-	0,38±0,03	0,41±0,05*	0,72±0,09*	0,57±0,14
	Контроль (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	-	0,39±0,06	0,43±0,06	0,62±0,08	0,80±0,05
		с глибенкламидом	-	0,60±0,08**	0,60±0,11	0,80±0,08	0,80±0,90
	Стресс (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	-	0,30±0,07	0,29±0,03	0,50±0,20	0,60±0,10
		с глибенкламидом	-	0,40±0,01	0,50±0,02**	0,90±0,12**	0,90±0,10

Продолжение таблицы 6.7

Максимальный гиперемический коронарный поток, мл×мин ⁻¹	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	-	13,4±0,58	-	-	18,6±0,91
	Стресс 6ч (n=9)	с глибенкламидом	-	-	7,3±0,36*	-	-	8,6±0,36*
		без глибенкламида	-	-	17,5±0,3 [#]	-	-	24,2±1,4 [#]
		с глибенкламидом	-	-	13,2±0,8*	-	-	17,4±0,9*
		без глибенкламида	-	-	12,3±0,58	-	-	16,3±1,15
	с глибенкламидом	-	-	7,1±0,42**	-	-	6,6±0,40**	
	Контроль (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	-	-	12,7±0,54	-	-	17,2±0,28
		с глибенкламидом	-	-	8,1±0,17**	-	-	10,1±0,75**
Коронарный расширительный резерв	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	-	-	1,42±0,02	-	-	1,80±0,03
	Стресс 6ч (n=9)	с глибенкламидом	-	-	1,65±0,06	-	-	1,63±0,02
		без глибенкламида	-	-	1,30±0,03 [#]	-	-	1,38±0,05 [#]
		с глибенкламидом	-	-	1,34±0,01	-	-	1,38±0,07
		без глибенкламида	-	-	1,40±0,03	-	-	1,54±0,07
	с глибенкламидом	-	-	1,60±0,06	-	-	1,70±0,12	
	Стресс (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	-	-	1,38±0,03	-	-	1,79±0,04
		с глибенкламидом	-	-	1,32±0,04	-	-	1,60±0,14
Внутри-желудочковое давление, мм рт.ст.	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	58,0±2,92	85,0±5,36	105,0±5,31	108,0±6,94	110,0±5,13	
	Стресс 6ч (n=9)	с глибенкламидом	40,0±4,23	63,0±4,37*	73,0±5,37*	78,0±6,57*	79,0±3,24*	
		без глибенкламида	47,0±4,6	72,0±3,9	94,6±3,7	110,3±3,9	117,0±6,2	
		с глибенкламидом	42,3±2,5	62,3±3,2*	79,0±1,6*	89,0±3,2*	95,6±6,2*	
		без глибенкламида	61,0±5,21	87,0±4,26	106,0±4,41	112,0±5,60	115,0±5,83	
	с глибенкламидом	44,0±4,11**	58,0±3,61**	68,0±4,70**	70,0±6,60**	72,0±7,42**		
	Стресс (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	56,0±1,6	84,0±2,8	102,0±3,5	107,0±3,6	116,0±4,1	
		с глибенкламидом	44,0±6,0	64,0±5,7**	75,0±8,4**	76,0±9,3**	77,0±8,6**	

Продолжение таблицы 6.7

Интенсивность перфузии, мл×мм рт.ст. ⁻¹	Контроль ГЛБ (10 мкМ) (n=9)	без глибенкламида	0,41±0,02	0,44±0,04	0,28±0,01	0,26±0,02	0,37±0,03
		с глибенкламидом	0,49±0,07	0,51±0,04	0,27±0,02	0,28±0,03	0,44±0,04
	Стресс 6ч (n=9)	без глибенкламида	0,50±0,05	0,50±0,03	0,50±0,03 [#]	0,40±0,03 [#]	0,40±0,02
		с глибенкламидом	0,50±0,02	0,40±0,01	0,36±0,02	0,33±0,03	0,36±0,03
	Контроль (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	0,36±0,02	0,43±0,02	0,30±0,01	0,29±0,01	0,33±0,01
		с глибенкламидом	0,39±0,03	0,37±0,03	0,32±0,05	0,32±0,05	0,33±0,08
	Стресс (в/б введение пинацидила) (n=7)	без глибенкламида	0,35±0,01	0,39±0,01	0,33±0,01	0,30±0,02	0,38±0,03
		с глибенкламидом	0,25±0,09	0,23±0,08	0,23±0,08	0,23±0,08	0,24±0,08

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с данными, полученными при перфузии изолированного сердца данной группы раствором Кребса-Хензелята, не содержащим глибенкламид; # - по сравнению с группой «контроль, не содержащей глибенкламид»; n-количество животных в группе; DMSO-диметилсульфоксид.

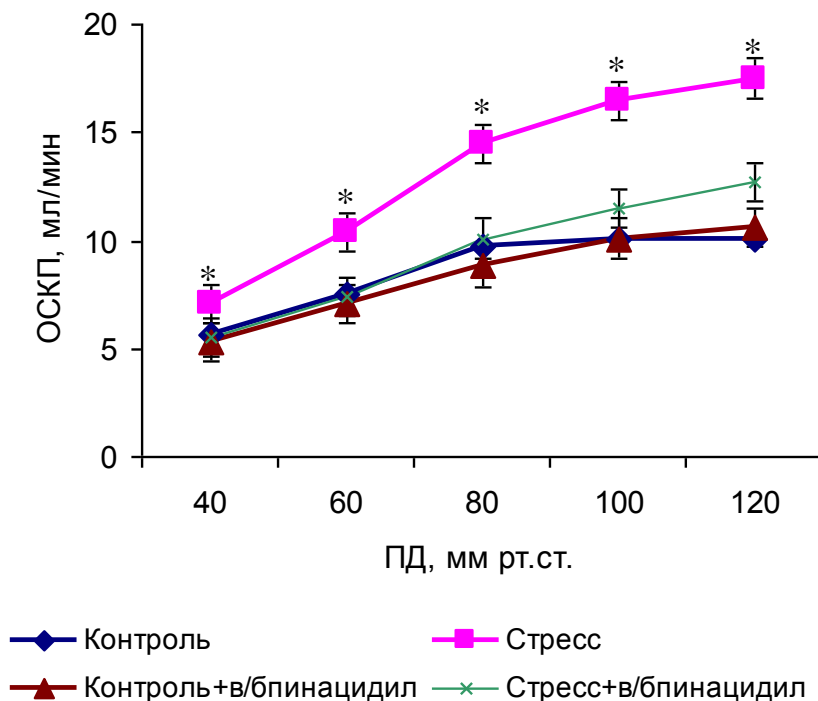


Рисунок 6.12. Изменение объемной скорости коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления (коронарная ауторегуляция) в группе животных перенесших иммобилизацию на фоне внутрибрюшинного введения пинацидила. По оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока в мл/мин. -* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Предварительное введение пинацидила в контрольной группе животных сопровождалось тенденцией увеличения коронароконстрикторного эффекта глибенкламида (на 13%), добавленного в раствор Кребса, что можно оценить как некоторое увеличение их функциональной активности связанное с предварительным введением активатора K_{ATP} -каналов. Однако, сократительная функция миокарда при этом снижалась как и в контроле на 36% ($p > 0,05$) (рис. 6.13, В). Интенсивность перфузии достоверно не изменялась.

Перфузия изолированного сердца животных перенесших стресс после предварительного введения пинацидила раствором с глибенкламидом сопровождалось таким же, как в контроле (на 34-41%) и более значительным, чем после стресса уменьшением объемной скорости коронарного потока (для сравнения после стресса объемная скорость коронарного потока снижалась на 28% $p < 0,05$, рис. 6.13, А). Индекс ауторегуляции увеличивался при перфузионном давлении от 80 до 120 мм рт.ст. на 72, 80, 50% соответственно. В сердцах животных перенесших стресс после пинацидила снижение максимального гиперемического потока под влиянием глибенкламида как и в контроле составляло 36-41% ($p > 0,05$) (для сравнения при стрессе на 24-28%) (рис. 6.13, Б), и указывало на сохранение функциональной активности K_{ATP} -каналов. В этой группе животных под влиянием глибенкламида развиваемое внутрижелудочковое давление снижалось при всех уровнях перфузионного давления в среднем на 28% (рис. 6.13, В, для сравнения в контроле на 29%; после стресса на 14% $p < 0,05$). Следовательно, можно заключить, что предварительное введение активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов пинацидила сопровождается увеличением функциональной активности данных каналов, и, очевидно, предупреждает их постстрессорное повреждение.

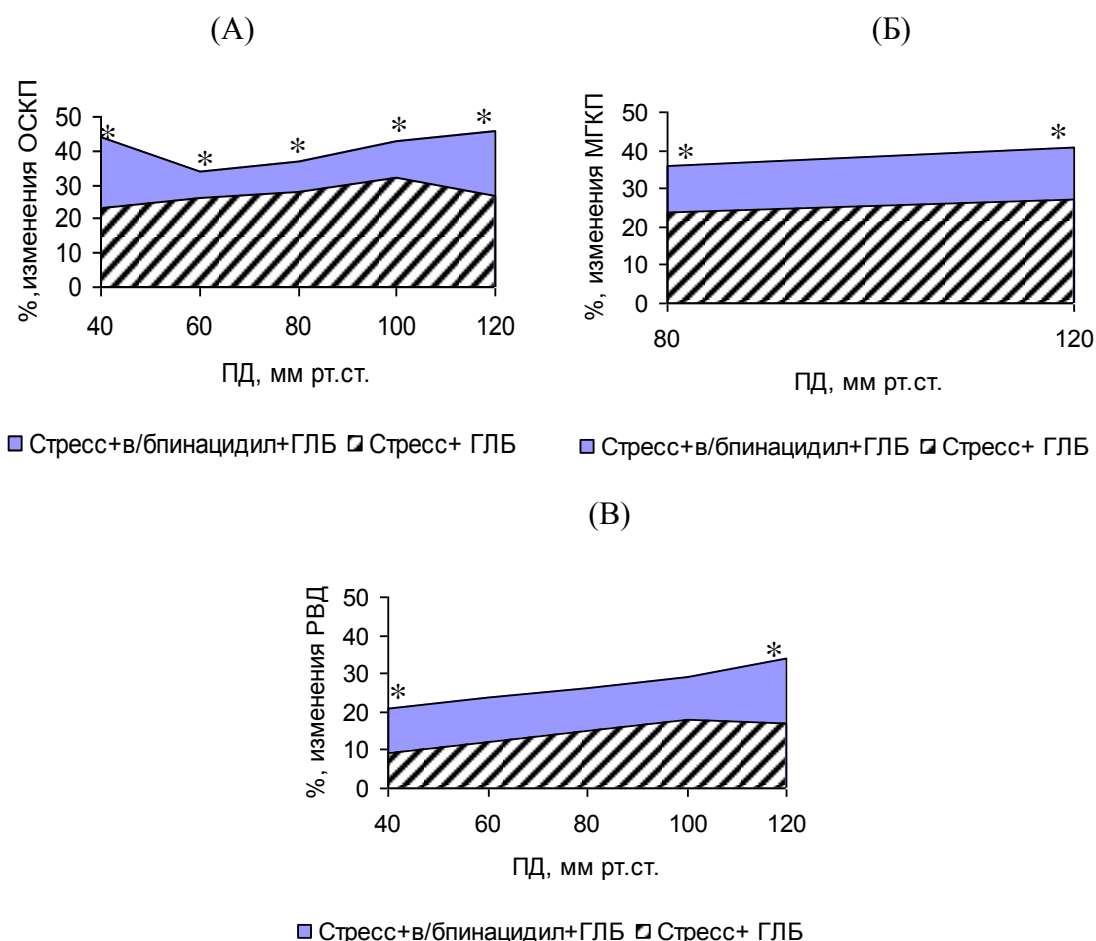


Рисунок 6.13. Влияние внутрибрюшинного введения пинацидила на изменения объемной скорости коронарного потока (А), максимального гиперемического коронарного потока (Б) и развиваемого внутрижелудочкового давления (В) у животных перенесших. По оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст., по оси ординат – % изменения. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой стресс + ГЛБ

Подводя итог, можно заключить, что блокада АТФ-чувствительных калиевых каналов в течение адаптации к коротким стрессорным воздействиям, приводит к нарушению формирования ее защитного эффекта. У адаптированных животных, получавших глибенкламид, иммобилизация сопровождалась теми же изменениями тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, как и у неадаптированных. Эти данные согласуются с работой Kane G. S et. al [19] о том, что, физическая нагрузка животных, в кардиомиоцитах которых отсутствовали КАТФ-каналы, не приводила к развитию адаптации, а сопровождалась появлением некрозов миокарда, аритмий и внезапной смерти.

Таким образом, реализация адаптационного эффекта коротких стрессорных воздействий существенным образом зависит от состояния КАТФ-каналов. В тоже время предварительное введение активатора КАТФ-каналов пинацидила полностью предупреждает появление постстрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. КАТФ-каналы, как один из представителей семейства калиевых каналов сарколеммы приводит к торможению вазоконстрикторной активности катехоламинов и многочисленных вазоактивных регуляторных молекул, накапливающихся в крови при длительном стрессе. Это происходит благодаря ограничению накопления ионов кальция в гладких миоцитах, что предупреждает развитие вазоконстрикторных реакций, которые могут окончиться сосудистым спазмом. Этот факт становится очень важным, если учесть, что длительный и интенсивный

иммобилизационный стресс приводит к уменьшению функциональной активности K_{ATP} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и сопровождается снижением их чувствительности к активаторам, расширяющим сосуды, а также увеличивает чувствительность сосудов сердца к коронароконстрикторам [1]. Последнее создает условия для возникновения явления подобного стенокардии Принцметала [35]. В результате можно сделать заключение о том, что K_{ATP} -каналы могут рассматриваться как одна из стресс-лимитирующих систем, расположенная в гладкомышечных клетках коронарных сосудов.

Кроме того, на основании представленных фактов можно констатировать, что активаторы K_{ATP} -каналов обладают защитным эффектом и могут быть использованы для предупреждения постстрессорных нарушений сократительной функции гладкомышечных клеток коронарных сосудов и кардиомиоцитов.

6.7.1. Предварительное введение пинацидила предупреждает постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов

Активаторы калиевых каналов, включая диазоксид, пинацидил, кромакалим и никорандил, являются структурно разнообразной группой препаратов, которые открывают K_{ATP} каналы в различных типах клеток, таким образом, вызывая гиперполяризацию плазматической мембраны и уменьшая электрическую активность [17].

Было показано, что различные SUR субъединицы обладают различной чувствительностью к активатору. Например, Kir6.2/SUR1 каналы активируются только диазоксином, Kir6.2/SUR2A каналы активируются пинацидилем и кромакалимом, однако слабо диазоксином, в то время как Kir6.2/SUR2B каналы активируются диазоксином, пинацидилем и кромакалимом. [15, 20, 28, 30] Кроме того, недавнее исследование показало, что активаторы, такие как пинацидил, стимулируют гидролиз АТФ в NBF-2 и, тем самым вызывая открытие канала, стабилизируют его в Mg-нуклеотид связанном состоянии [18, 41].

Активация K_{ATP} -каналов приводит к гиперполяризации мембраны, в результате снижения концентрации свободного внутриклеточного кальция проявляются вазодилаторные эффекты в клетках гладкой мускулатуры (сосудов, бронх, мочевого пузыря и т.д.). Показано, что активаторы калиевых каналов проявляют сосудорасширяющие, гипотензивные и антигипертензивные эффекты, сопровождающиеся тахикардией и стимуляцией ренин-ангиотензиновой системы [29].

Однако мало данных о роли активатора K_{ATP} -каналов, в частности, пинацидила, в предупреждении стрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов.

Учитывая вышеописанные факты, мы предположили, что 1) пинацидил может быть вовлечен в механизмы профилактики стресс-индуцированных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда; 2) предварительное использование пинацидила предупреждает стресс-индуцированное снижение функциональной активности K_{ATP} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Все животные были разделены на группы: 1-ая группа – интактные животные (n=8); 2-ая группа – контрольные животные, которым в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили физиологический раствор – «Контроль» (n=8); 3-я - животные, которым в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили пинацидил – «Контроль+пинацидил» (n=8), 4-ая – «Стресс» (n=8); 5-ая – группа животных, перенесших стресс на фоне предварительного внутрибрюшинного введения пинацидила – «Стресс+пинацидил» (n=8).

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа (методика описана выше) в условиях постоянного потока. Каждый эксперимент состоял из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензеляйта, содержащим растворитель в концентрации 0,05% (v/v). На втором этапе перфузировали таким же

раствором, но с добавлением ингибитора К_{АТФ}-каналов глибенкламида (ГЛБ, который растворяли в DMSO - Dimethyl sulfoxide) в концентрации 10 мкМ. Таким образом, эксперименты были выполнены на одном сердце. Вклад каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта глибенкламида, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления, выраженного в % от исходного.

Показатели коронарного перфузионного (КПД) и развиваемого внутрижелудочкового давления (РВД) между группами «Интактные животные» и «Контрольные животные» не различались. Исходя из этого, сравнительный анализ полученных результатов производился по отношению к группе «Контроль».

В группе контрольных животных коронарное перфузионное давление (КПД), определяемое при ОСКП 10 мл/мин, составляло 78 мм рт. ст., а развиваемое внутрижелудочковое давление – 77 мм рт.ст. Добавление в перфузионный раствор блокатора К_{АТФ}-каналов ГЛБ сопровождалось изменением КПД на 92%, а РВД уменьшалось на 29%. Показатели КПД и РВД в группах «Контроль» и «Контроль+пинацидил» были сопоставимы между собой. Введение в коронарное русло ГЛБ группы «Контроль+пинацидил» сопровождалось изменением КПД на 118% ($p > 0,05$, по сравнению с группой «Контроль+ГЛБ»). РВД при этом изменялось на 29%. Таким образом, после внутрибрюшинного введения пинацидила наблюдалась тенденция к увеличению функциональной активности К_{АТФ}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

В сердцах животных, перенесших стресс, КПД и РВД снижались на 23 и 26%, соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контрольными показателями). Следовательно, иммобилизационный стресс приводил к постстрессорному снижению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. Добавление ГЛБ в коронарное русло изолированного сердца крыс, перенесших 6-часовую иммобилизацию, сопровождалось изменением КПД на 76%, что было на 16% меньше, чем в контроле ($p < 0,05$). Под влиянием ГЛБ величина развиваемого внутрижелудочкового давления в группе «Стресс» изменялась на 21% ($p < 0,05$, для сравнения, изменение РВД в контроле составило 29%). Стресс снижал эффективность действия ГЛБ в отношении величины КПД и РВД, что может быть обусловлено снижением функциональной активности К_{АТФ}-каналов гладкомышечных, эндотелиальных клеток коронарных сосудов и кардиомиоцитов, то есть длительный эмоционально-болевой стресс сопровождается появлением постстрессорной «каналопатии».

Иммобилизационный стресс на фоне предварительного внутрибрюшинного введения пинацидила не сопровождался изменением тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, значения были сопоставимы с данными контрольной группы животных. В группе «Стресс+пинацидил» интракоронарное введение ГЛБ сопровождалось изменением КПД на 95,5% (данные не отличаются от группы «Контроль+ГЛБ», рис. 6.14, 6.15), а РВД на 27%. Таким образом, предварительная активация К_{АТФ}-каналов пинацидилом предупреждает постстрессорное снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, а также вызванные тяжелым стрессом нарушения функциональной активности К_{АТФ}-каналов эндотелиальных и гладкомышечных клеток коронарных сосудов и клеток миокарда.

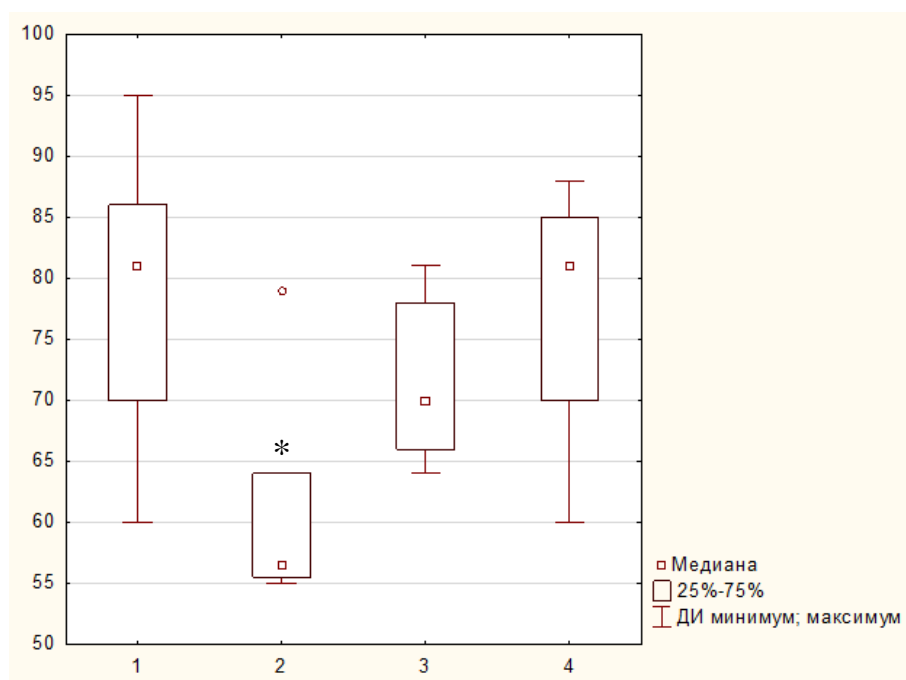


Рисунок 6.14. Влияние предварительного введения пинацидила на величину коронарного перфузионного давления у экспериментальных животных. Примечание: По оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль»; 2 – «Стресс»; 3 – «Контроль+пинацидил»; 4 – «Стресс+пинацидил»; по оси ординат – величина коронарного перфузионного давления в мм рт. ст. * - $p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль»

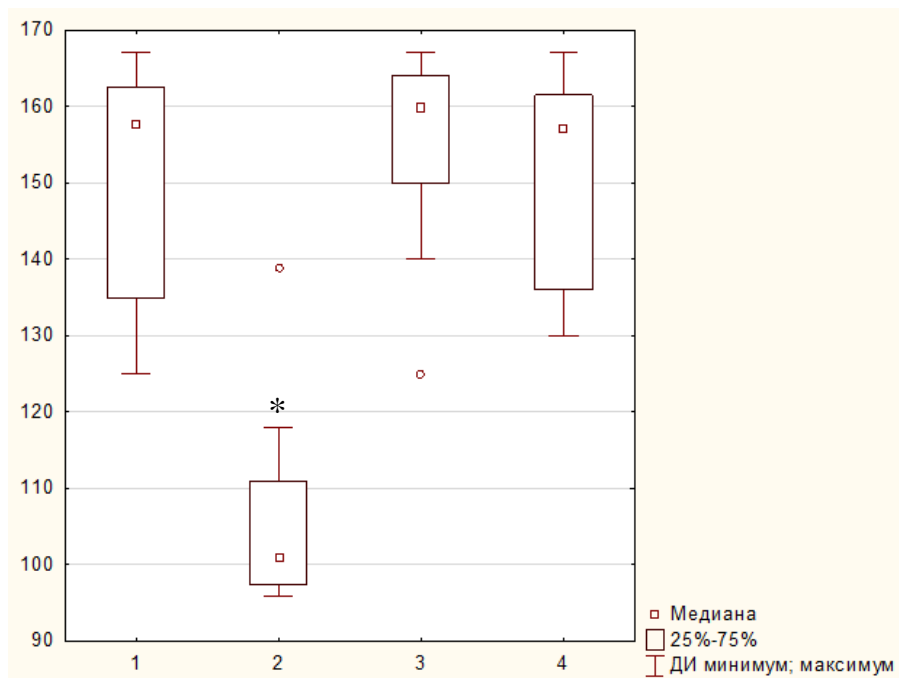


Рисунок 6.15. Влияние глибенкламида (ГЛБ) на изменение величины коронарного перфузионного давления у экспериментальных животных. Примечание: по оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль+ГЛБ»; 2 – «Стресс+ГЛБ»; 3 – «Контроль+пинацидил+ГЛБ»; 4 – «Стресс+пинацидил+ГЛБ»; по оси ординат – величина коронарного перфузионного давления в мм рт. ст. * - $p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль+ГЛБ»

В гомогенате миокарда крыс групп «Стресс» уровень транскриптов, кодирующих iNOS и NFκB, был выше в 6 и 1,8 раз, соответственно. Экспрессия генов eNOS при этом не изменялась. В группе «Контроль+пинацидил» уровень экспрессии генов, кодирующих iNOS, eNOS и NFκB, увеличивались в 1,9, 1,1 и 1,0 раза, соответственно.

В сыворотке крови животных, перенесших стресс, активность iNOS увеличивалась в 3 раза, а eNOS – снижалась на 52%, по сравнению с контрольными показателями. В группе животных «Контроль+пинацидил» активность iNOS увеличивалась на 79%. А в группе «Стресс+пинацидил» активность iNOS возрастала в 1,1 раза ($p<0,05$), при этом значения активности eNOS между группами не различались.

В группе животных, перенесших стресс, содержание eNOS в сыворотке крови снижалось на 78%, а индуцибельной – возрастало в 9 раз. В группе «Контроль+пинацидил» и «Стресс+пинацидил» содержание фермента eNOS и iNOS не отличались от контрольных показателей (табл. 6.8).

Концентрация $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ в плазме крови крыс группы «Стресс» увеличивалась на 41% ($p<0,05$, по сравнению с контрольным значением). В группах «Контроль+пинацидил» и «Стресс+пинацидил» концентрация $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ была такой же, как и в контроле (табл. 6.8).

Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в миокарде после перенесенного стресса, возрастало в 3 раза (табл. 6.8), по сравнению с контрольными показателями, а в группах «Контроль+пинацидил» и «Стресс+пинацидил» не отличалось от контрольных значений (табл. 6.8).

В группе «Стресс» концентрация С-реактивного белка увеличивалась в 2 раза, по сравнению с контрольными показателями, напротив, в группах «Контроль+пинацидил» и «Стресс+пинацидил» концентрация С-реактивного белка не отличалась от показателей группы «Контроль». Концентрация ИЛ-1β в сыворотке животных перенесших стресс составляла 22,3 пг/мл ($p<0,001$, для сравнения в контроле 0,6 пг/мл). Содержание ИЛ-1β в сыворотке животных групп «Контроль+пинацидил» и «Стресс+пинацидил» не отличалось от контрольных значений (табл. 6.8).

Таблица 6.8. Влияние предварительного использования пинацидила на изменение концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови; NO²/NO³⁻, продуктов ПОЛ (ДК; МДА) и АОА (СОД; КАТ) в гомогенате миокарда, экспериментальных животных.

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ² /NO ³ ⁻ мкМ в миокарде	Концентрация ДК, нМ/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нМ/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкМ/г миокарда	Концентрация С-RB, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=20)	47,20 (41,6;63,3)	2,66 (2,39;2,93)	24,30 (23,0;24,5)	100,44 (76,0;128,1)	77,66 (74,3;93,1)	70,27 (66,2;77,8)	68,12 (37,7;80,9)	0,21 (0,07;0,23)	0,00
Стресс (n=13)	10,10 (7,3;14,6) p=0,003	18,80 (15,1;32,4) p=0,0004	33,10 (29,9;43,1) p=0,0007	329,29 (94,2;643,1) p=0,0007	278,65 (190,4;281,9) p=0,0001	39,40 (28,9;37,5) p=0,0007	34,9 (32,6;46,8) p=0,034	0,36 (0,24;0,39) p=0,003	19,50 (18,5;23,7) p=0,003
Контроль+ пинацидил (n=8)	32,00 (26,0;39,0)	2,87 (2,7;3,4)	23,70 (23,1;26,2)	88,10 (68,0;110,0)	91,60 (85,0;98,3)	77,70 (75,4;80,1)	76,50 (66,0;80,9)	0,18 (0,15;0,21)	0,00
Стресс+ пинацидил (n=8)	40,00 (41,7;60,1)	1,93 (1,98;2,90)	23,60 (23,1;24,2)	115,00 (112,2;125,8)	93,20 (87,2;98,0)	77,20 (74,5;80,3)	77,00 (66,3;80,5)	0,20 (0,18;0,21)	0,00

Примечание - p<0,05 по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

В препаратах сердец крыс групп «Контроль+пинацидил», eNOS локализовалась в кардиомиоцитах, реакция была выраженной (+++), в эндотелии сосудов – выраженная (+++), в гладкомышечных клетках сосудов – умеренная (++) (рис. 6.16, А). Экспрессия iNOS в группе «Контроль+пинацидил» наблюдалась в кардиомиоцитах и эндотелии сосудов. Реакция iNOS в кардиомиоцитах и гладкомышечных клетках была –умеренной (++) , в эндотелии сосудов (+) – слабая (рис. 6.17, А).

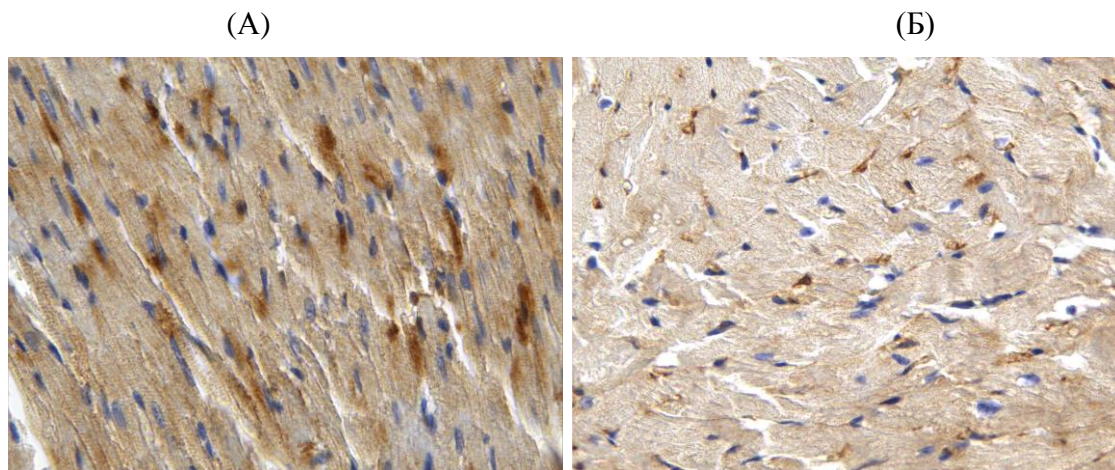


Рисунок 6.16. Экспрессия eNOS в образцах миокарда крыс: (А) Пинацидил; (В), Пинацидил+стресс. Окраска, anti-eNOS antibody. Увеличение 200

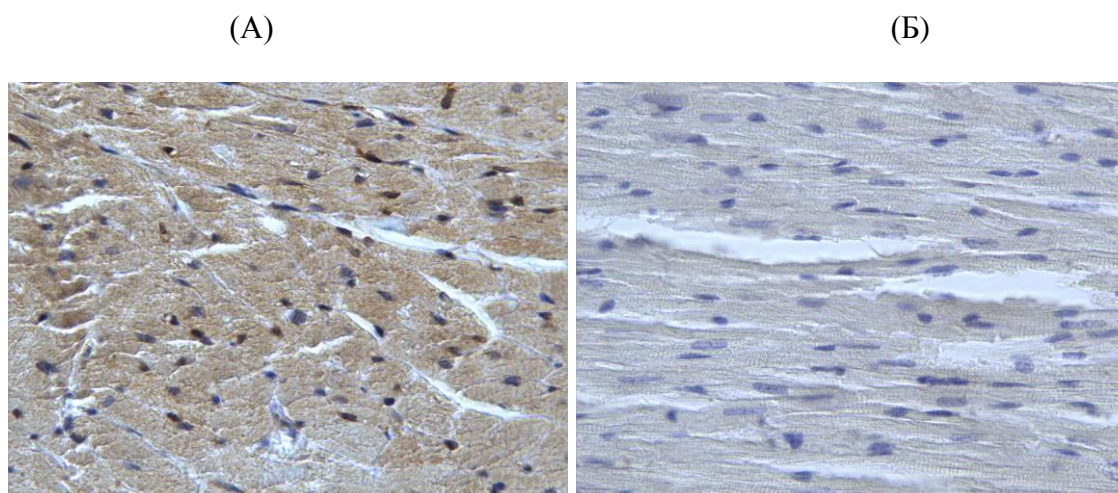


Рисунок 6.17. Экспрессия iNOS в образцах миокарда крыс: (А) Пинацидил; (В), Пинацидил+стресс. Окраска, anti-iNOS antibody. Увеличение 200

В группе животных «Стресс+пинацидил» реакция eNOS была умеренной (++), окрашивание отмечалось в эндотелии сосудов и в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 6.16, Б). Реакция iNOS была слабой (+), преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 6.17, Б). Данные групп «контроль» и «стресс» - описаны ранее.

Полученные экспериментальные данные позволяют констатировать, что КатФ-каналы играют ключевую роль в механизмах предупреждения постстрессорного нарушения тонуса коронарных сосудов. Пинацидил может быть рассмотрено как вещество, которое умеренно активирует iNOS, что создает условия для осуществления полноценного адаптационного ответа и является проявлением нормальных взаимоотношений систем локальной регуляции тонуса сосудов сердца. Умеренная

активация iNOS пинацидилем, вероятно, играет важную роль в поддержании адекватной биодоступности NO, участвующего в механизмах локальной регуляции тонуса сосудов сердца при стрессе.

6.7.2. Предварительное введение 2-бензимидазола гидробромида предупреждает постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов

В век развития научно-технического прогресса, человек все чаще и продолжительнее испытывает психоэмоциональные перегрузки, связанные с напряженной интеллектуальной и управленческой деятельностью, высокими темпами и интенсификацией производства, с решением социально-экономических задач, усложнением межличностных отношений. Все эти и ряд других факторов являются ведущими причинами в возникновении целого ряда психических, нервных и психосоматических заболеваний.

Болезни системы кровообращения являются наиболее частой причиной смерти людей во всем мире. По этой причине ежегодно умирает более 18 миллионов человек. В связи с этим, проблема профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, является наиболее актуальной и не только в нашей стране.

Все больший интерес в различных областях медицинской химии привлекают производные бензимидазола. Эти гетероциклы обладают различной фармакологической активностью: кардиотропной [6, 10, 21, 33], антиоксидантной [50], антиаритмической [27]. Zhang и соавт. показали, что эти соединения могут тормозить процессы ремоделирования миокарда, а также относиться к веществам, ингибирующим Na^+/H^+ обменник [21, 22]. Был продемонстрирован антигипертензивный эффект производных бензимидазола [36]. Изучены кардиозащитные и инотропные его эффекты [23, 27]. Производные бензимидазола способны снижать агрегацию тромбоцитов, а в условиях гипоксии стабилизировать работу сердца [12, 13].

Известно, что производные бензимидазола активируют VK_{Ca} -каналы гладкомышечных клеток. Например, действие производного бензимидазола NS1619, которое является «золотым стандартом» таких активаторов, сопровождается образованием супероксидного радикала, в результате чего активируются митохондриальные VK_{Ca} -каналы, и, как следствие, наблюдается кардиопротекция, вызванная прекондиционированием [37, 42]. Ранее нами было показано, что производное бензимидазола – 2-этил-тиобензимидазола гидробромид (2-ЭТГ) активирует VK_{Ca} -каналы и оказывает вазодилататорный эффект на гладкомышечные клетки сосудов аорты крыс [7]. Однако мало данных о влиянии производных бензимидазола при иммобилизационном стрессе в регуляции тонуса коронарных сосудов, сократительной функции миокарда и функциональной активности кальцием активируемых калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках венечных сосудов.

Учитывая вышеописанное и в продолжение исследований производных бензимидазола, в нашей работе мы тестировали гипотезу о том, что: 1) предварительное использование 2-ЭТГ может быть вовлечен в механизмы профилактики стресс-индуцированных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда; 2) предварительное использование 2-ЭТГ предупреждает стресс-индуцированное снижение функциональной активности VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Все животные были разделены на группы: 1-ая группа – интактные животные (n=8); 2-ая группа – контрольные животные, которым в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили физиологический раствор – «Контроль» (n=8); 3-я - животные, которым в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили 2-этил-тиобензимидазола гидробромид в дозе 3 мг/кг – «Контроль+2-ЭТГ» (n=8), 4-ая – «Стресс» (n=8); 5-ая – группа животных, перенесших стресс на фоне предварительного внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ – «Стресс+2-ЭТГ» (n=8).

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа в условиях постоянного потока (метод описан ранее). Каждый эксперимент состоял из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелята, на втором таким же раствором, но с добавлением ингибитора VK_{Ca} -каналов тетраэтиламмония (ТЭА) в концентрации 1 мМ. Вклад каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта тетраэтиламмония, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления, выраженного в % от исходного.

После 6-ти часового иммобилизационного стресса наблюдалось изменения массы стресс-реагирующих органов. Так относительная масса надпочечников увеличивалась на 65%, а селезенки - снижалась на 35% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). В группах «Контроль+2-ЭТГ» и «Стресс+2-ЭТГ» значения относительной массы надпочечников и селезенки не отличались от контрольных показателей.

Показатели коронарного перфузионного (КПД), развиваемого внутрижелудочкового давления (РВД), а также показатели биохимических исследований между группами «Интактные животные» и «Контрольные животные» не различались. Исходя из этого, сравнительный анализ полученных результатов будет производиться по отношению к группе «Контроль».

В группе контрольных животных коронарное перфузионное давление (КПД), определяемое при ОСКП 10 мл/мин, составляло $82 \pm 2,2$ мм рт. ст., а развиваемое внутрижелудочковое давление – $79 \pm 2,4$ мм рт.ст. Добавление в перфузионный раствор блокатора VK_{Ca} -каналов ТЭА сопровождалось коронароконстрикторным эффектом при этом КПД составило $160 \pm 3,9$ мм рт.ст. (увеличение составило 95% от исходного уровня КПД), РВД при этом не изменялось. Показатели КПД и РВД в группах «Контроль» и «Контроль+2-ЭТГ» были сопоставимы между собой. Введение в коронарное русло ТЭА группы «Контроль+2-ЭТГ» сопровождалось изменением КПД на 113% и составляло $176 \pm 3,4$ мм рт.ст. ($p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль+ТЭА»). РВД при этом не изменялось. Таким образом, внутрибрюшинное введение 2-ЭТГ приводило к увеличению функциональной активности VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

В сердцах животных, перенесших стресс, КПД составляло $63 \pm 1,8$ мм рт.ст., РВД – $63 \pm 2,3$ мм рт. ст. таким образом снижение составило 23 и 20%, соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контрольными показателями). Следовательно, иммобилизационный стресс приводил к постстрессорному снижению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. Добавление ТЭА в коронарное русло изолированного сердца крыс, перенесших 6-часовую иммобилизацию, сопровождалось изменением КПД на 68%, что было на 27% меньше, чем в контроле и составляло $105 \pm 8,0$ мм рт.ст. ($p < 0,05$). ТЭА не оказывал влияния на величину развиваемого внутрижелудочкового давления в группе «Стресс». Вероятно, VK_{Ca} -каналы расположены преимущественно в гладкомышечных клетках коронарных сосудов, но не в миокарде. Стресс снижал эффективность действия ТЭА в отношении величины КПД, что может быть обусловлено снижением функциональной активности VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Иммобилизационный стресс на фоне предварительного внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ не сопровождался изменением тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, значения были сопоставимы с данными контрольной группы животных. В группе «Стресс+2-ЭТГ» интракоронарное введение ТЭА сопровождалось изменением КПД на 89% и составляло $154,0 \pm 5,4$ (данные не отличаются от группы «Контроль+ТЭА»), РВД при этом не изменялось. Таким образом, предварительная активация VK_{Ca} -каналов 2-ЭТГ предупреждает постстрессорное снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, а также вызванные тяжелым стрессом нарушения функциональной активности VK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

В гомогенате миокарда крыс групп «Стресс» уровень транскриптов, кодирующих iNOS и NF κ b, был выше в 6 и 1,8 раз, соответственно. Экспрессия генов eNOS при этом не изменялась. В группе «Контроль+2-ЭТГ» уровень экспрессии генов, кодирующих iNOS, eNOS и NF κ b, увеличивались в 8, 2,9 и 1,5 раза, соответственно.

В сыворотке крови животных, перенесших стресс, активность iNOS увеличивалась в 3 раза, а eNOS – снижалась на 52% и составляла $130 \pm 15,0$ и $51 \pm 7,6$ нмоль/г белка в минуту соответственно, (для сравнения в контроле iNOS - $40 \pm 11,0$ eNOS - $106 \pm 9,5$ нмоль/г белка в минуту). В группе животных «Контроль+2-ЭТГ» активность фермента iNOS и eNOS увеличивались, в 1,6 раза и на 55%, соответственно (активность iNOS составляла $103 \pm 21,5$, eNOS - $166 \pm 46,2$ нмоль/г белка в минуту). В группе «Стресс+2-ЭТГ» активность iNOS возрастала в 2,3 раза, при этом значения активности eNOS – увеличивались на 40% и составляли $92 \pm 10,3$ и $149 \pm 21,7$ нмоль/г белка в минуту, соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, табл. 6.9).

В группе животных, перенесших стресс, содержание eNOS в сыворотке крови составляло $11 \pm 1,8$ пг/мл, а iNOS - $29 \pm 10,4$ нг/мл, таким образом, концентрация эндотелиальной NO-синтазы снижалась на 78%, а индуцибельной – возрастала в 9 раз (для сравнения в контроле содержание eNOS - $51 \pm 5,5$ пг/мл, iNOS – $3 \pm 0,2$ нг/мл). В группе «Контроль+2-ЭТГ» содержание eNOS - $47 \pm 18,1$ пг/мл, iNOS – $4 \pm 0,8$ нг/мл; в группе «Стресс+2-ЭТГ» содержание eNOS - $39 \pm 6,9$ пг/мл, iNOS – $3 \pm 0,2$ нг/мл таким образом, содержание ферментов eNOS и iNOS статистически не отличались от контрольных показателей (табл. 6.9).

Концентрация NO^2/NO^3 в гомогенате левого желудочка группы «Стресс» увеличивалась на 41% и составила $34 \pm 2,8$ мкМ ($p < 0,05$, контрольные показатели - $24 \pm 0,8$ мкМ). В группах «Контроль+2-ЭТГ» и «Стресс+2-ЭТГ» концентрация NO^2/NO^3 была такой же, как и в контроле (табл. 6.9).

Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в миокарде после перенесенного стресса, составляла $377 \pm 98,3$ нМ/г липидов и $295 \pm 64,7$ нМ/г белка соответственно ($p < 0,05$, для сравнения в контроле концентрация диеновых конъюгатов - $109 \pm 15,4$ нМ/г липидов и малонового диальдегида - $79 \pm 8,7$ нМ/г белка), а в группах «Контроль+2-ЭТГ» и «Стресс+2-ЭТГ» значения не отличались от контрольных показателей (табл. 6.9).

В группе «стресс» концентрация С-реактивного белка увеличивалась в 2 раза и составляла $0,317 \pm 0,05$ мг/л (для сравнения в контроле концентрация С-реактивного белка составляла $0,162 \pm 0,03$ мг/л), напротив, в группах «Контроль+2-ЭТГ» и «Стресс+2-ЭТГ» концентрация С-реактивного белка не отличалась от показателей группы «Контроль». Концентрация ИЛ-1 β в сыворотке животных перенесших стресс составляла $22,3 \pm 2,3$ пг/мл ($p < 0,001$, для сравнения в контроле $0,6$ пг/мл). Содержание ИЛ-1 β в сыворотке животных групп «Контроль+2-ЭТГ» и «Стресс+2-ЭТГ» не отличалось от контрольных значений (табл. 6.9).

В препаратах сердец крыс групп «Контроль+2-ЭТГ», eNOS локализовалась в кардиомиоцитах, реакция была от умеренной (++) до выраженной (+++), в эндотелии сосудов – умеренная (++) (рис. 6.18, А). Экспрессия iNOS в группе «Контроль+2-ЭТГ» наблюдалась в кардиомиоцитах и эндотелии сосудов. Реакция iNOS в кардиомиоцитах была – от слабой (+) до умеренной (++) , в эндотелии сосудов (+) – слабая (рис. 6.19, В). В группе животных «Стресс+2-ЭТГ» реакция eNOS была выраженной (+++), окрашивание отмечалось в эндотелии сосудов и в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 6.18, Б). Реакция iNOS была слабой (+), преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 6.19, Г).

Таблица 6.9. Влияние предварительного использования 2-ЭТГ на изменение концентрации NOS, ИЛ-1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови; NO²/NO³⁻, продуктов ПОЛ (ДК; МДА) и АОА (СОД; КАТ) в гомогенате миокарда, экспериментальных животных.

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ² /NO ³ ⁻ мкМ в миокарде	Концентрация ДК, нМ/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нМ/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкМ /г миокарда	Концентрация C-RB, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=20)	47,20 (41,6;63,3)	2,66 (2,39;2,93)	24,30 (23,0;24,5)	100,44 (76,0;128,1)	77,66 (74,3;93,1)	70,27 (66,2;77,8)	68,12 (37,7;80,9)	0,21 (0,07;0,23)	0,00
Стресс (n=13)	10,10 (7,3;14,6) p=0,003	18,80 (15,1;32,4) p=0,0004	33,10 (29,9;43,1) p=0,0007	329,29 (94,2;643,1) p=0,0007	278,65 (190,4;281,9) p=0,0001	39,40 (28,9;37,5) p=0,0007	34,9 (32,6;46,8) p=0,034	0,36 (0,24;0,39) p=0,003	19,50 (18,5;23,7) p=0,003
Контроль+2-ЭТГ (n=8)	28,70 (27,0;35,0)	3,30 (2,9;5,8)	23,80 (21,6;24,3)	106,10 (101,0;118,0)	74,40 (54,5;97,8)	100,30 (97,2;103,7)	81,00 (73,8;90,5)	0,18 (0,18;0,23)	0,00
Стресс+2-ЭТГ (n=8)	29,70 (28,6;54,5)	3,60 (3,1;3,9)	23,80 (23,0;24,0)	100,40 (77,8;128,1)	76,20 (74,3;93,2)	74,40 (67,3;77,8)	69,70 (63,5;81,5)	0,17 (0,14;0,19)	0,00

Примечание - p<0,05 по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

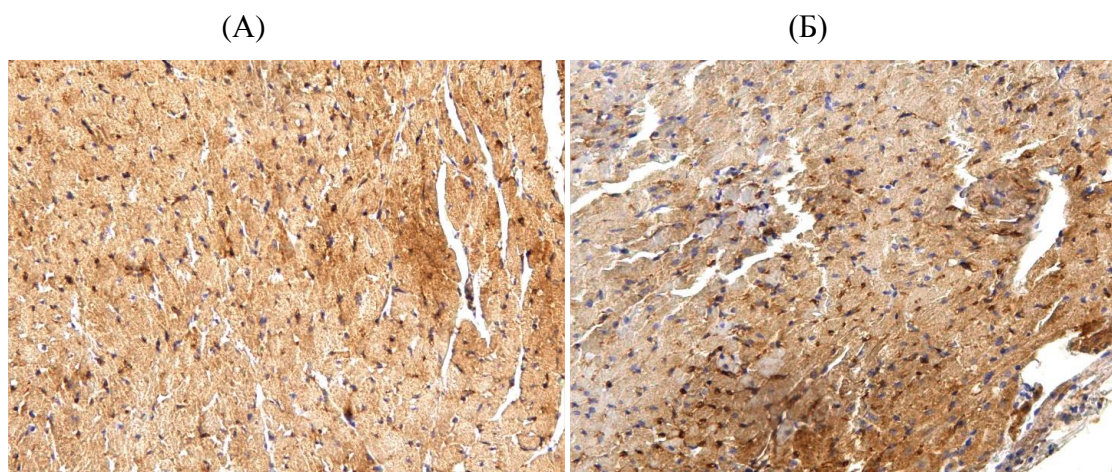


Рисунок 6.18. Экспрессия eNOS в образцах миокарда крыс: (А), Контроль+2-ЭТГ; (Б), Стресс+2-ЭТГ. Окраска, anti-eNOS antibody. Увеличение 100

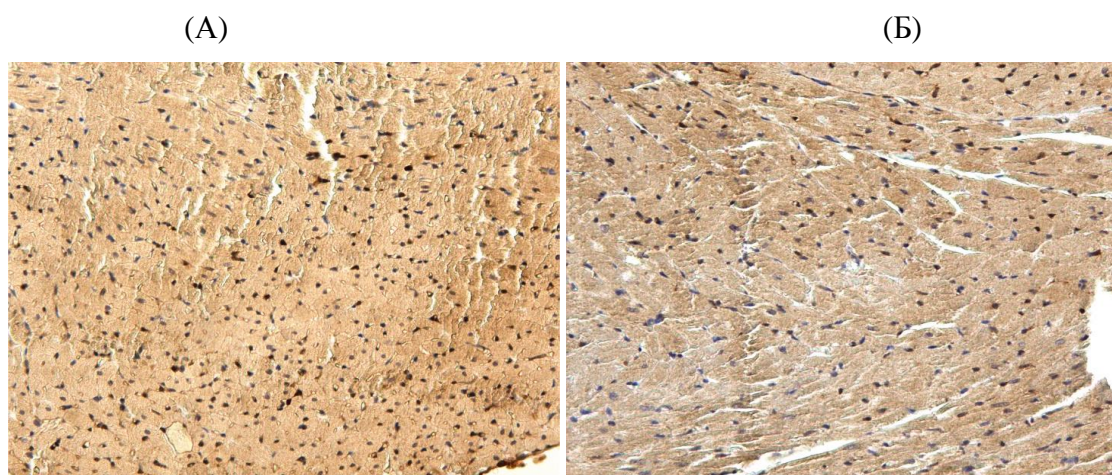


Рисунок 6.19. Экспрессия iNOS в образцах миокарда крыс: (А), Контроль+2-ЭТГ; (Б), Стресс+2-ЭТГ. Окраска Anti-inos antibody. Увеличение 100

Во-первых, производные бензимидазола модифицируют редокс-состояние клетки, стимулируя синтез восстановленного глутатиона [43], и iNOS, который является редокс-чувствительным ферментом [40]. Во-вторых, предварительное использование 2-ЭТГ может стимулировать образование аггросом в контрольной группе [38]. Аггросомы представляют собой цитозольные мультипротеиновые структуры, содержащие iNOS, который продуцирует NO в значительно меньшем количестве, чем белок-несвязанный фермент. Считается, что образование аггросом является важным механизмом для ограничения продукции NO, продуцируемого iNOS [38, 49]. Умеренная активация iNOS, вызванная 2-ЭТГ в контрольной группе, создала условия для развития адаптивного ответа, который отражает нормальные взаимосвязи локальных систем регуляции тонуса коронарных сосудов.

Таким образом, предварительное использование 2-ЭТГ предупреждало снижение активности ВКС_{Ca}-каналов и eNOS, ограничивала активность iNOS в коронарных сосудах и восстанавливала сократительную функцию миокарда после 6-часового иммобилизационного стресса. Выявленные нами эффекты 2-ЭТГ вместе с его способностью защищать стресс-реагирующие органы и ограничивать окислительный, нитрозативный стресс, системное воспаление позволяют предположить, что 2-ЭТГ может использоваться для профилактики стрессовых повреждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям предупреждает увеличение чувствительности сосудов сердца к метилэргоновину после 6-ти часовой иммобилизации / С.С. Лазуко [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: 59 итоговая научно-практическая конференция студентов и молодых ученых – Витебск, 2007 – С. 180-182.
2. Виноградов, В. М. Фармакологическая защита головного мозга от гипоксии / В. М. Виноградов, Б. И. Криворучко // Психофармакологическая и биологическая наркология. – 2001. – Т.1, № 1. – С. 27-37.
3. Зарубина, И. В. Фармакологическая защита мозга, сердца и печени от острой гипоксии / И.В. Зарубина, П. Д. Шабанов // Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 2. – С.49-57.
4. Изучение антиишемического действия «Афобазола» в условиях экспериментального инфаркта миокарда / С. А. Крыжановский и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 9. – С. 284-287.
5. Изучение механизмов мембранотропного действия соединения РУ-1203 на ионные каналы нейронов прудовика / О. Ю. Гречко и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 276-280.
6. Кардиопротективные эффекты афобазола у животных с хронической ишемией миокарда / С.А. Крыжановский и др. // Молекулярная медицина. – 2013. № 5. – С. 37-42.
7. Лазуко, С.С. 2-этилтиобензимидазола гидробромид активирует ВКСа-каналы гладкомышечных клеток аорты крыс / С.С. Лазуко // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т.13, №4. – С. 36-41.
8. Марышева, В. В. Антигипоксантами аминотиолового ряда / В. В. Марышева // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 17-27.
9. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – Москва: Новая волна, 2005. – 439 с.
10. Плейотропные (кардиотропные) эффекты анксиолитика афобазола (обзор экспериментальных исследований) / С.А. Крыжановский и др. // Терапевт. – 2012. – №1. – С. 32-40.
11. Сорокина, Е. А. Влияние бемитила на цитохром р-450-зависимые монооксигеназы в печени крыс и лимфоцитах человека / Е. А. Сорокина, С. В. Сибиряк, С. А. Сергеева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – № 3. – С. 31-34
12. Спасов, А.А. P2Y1-рецепторы и их влияние на процессы агрегации тромбоцитов / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 43, №3. – С. 4-11.
13. Спасов, А.А. Противоишемические свойства нового антиоксидантного средства эноксифола / А.А. Спасов, В.А. Косолапов, О.В. Островский // Экспер. и клин. фармакология. – 2003. – Т. 66, №4. – С. 17-20.
14. Фармакокинетика некоторых производных бензимидазола / А. А. Спасов и др. // Вопросы медицинской химии. – 2002. – № 3. – С. 233-258.
15. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel / S. Isomoto [et al.] // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 40. – P. 24321–24324.
16. Activation of mitochondrial ATPdependent potassium channels by nitric oxide / N. Sasaki [et al.] Circulation. – 2000. – Vol. 101. – P. 439–445.
17. Ashcroft, F.M. New windows on the mechanism of action of KATP channel openers / Ashcroft, F.M., Gribble, F.M. // Trends Pharmacol. Sci. – 2000 b. – Vol. 21, № 11. P. 439-445.

18. ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex / M. Bienengraeber [et al.] // *Faseb J.* – 2000. – Vol. 14, № 13. – P. 1943–1952.
19. ATP-Sensitive K- Channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits / G. C. Kane [et al.] // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 3. – S169–S175.
20. Babenko, A.P. Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells / A.P. Babenko, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan // *Circ. Res.* – 1998b. – Vol. 83, № 11. – P. 1132–1143.
21. Barot, K.P. Novel research strategies of benzimidazole derivatives / K.P. Barot, S. Nikolova, I. Ivanov, M.D. Ghate // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13, № 10. – P. 1421–47.
22. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury / R. Zhang [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* – 2007. – Vol. 17, № 9. – P. 2430–2433.
23. Berger, C. Effects of the benzimidazole derivatives pimobendan and 2-(4-hydroxyphenyl)-5-(5-methyl-3-oxo-4,5-dihydro-2H-6-pyridazinyl) benzimidazole. HCl on phosphodiesterase activity and force of contraction in guinea-pig hearts / C. Berger, W. Meyer, H. Scholz, J. Starbatty. // *Arzneimittelforschung.* – 1985. – Vol. 35, № 11. – P. 1668–1673.
24. BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca²⁺ release in smooth muscle cells of porcine coronary artery / H. Yamamura [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2001 Feb. – Vol. 132, N 4. – P. 828–834
25. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions / P. D. Langton [et al.] // *J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260, N 3. – P. 927–934.
26. Cameron, J.S. Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress / J.S. Cameron, R. Baghdady // *Cardiovasc Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 788–796.
27. Characterization of the phosphodiesterase inhibition by 2-(3-methoxy-5-methylsulfinyl-2-thienyl)-1H-imidazo-(4,5-c)-pyridine HCl and its sulfide- and sulfone derivatives in myocardial preparations from failing human hearts / T. Bethke [et al.] // *Arzneimittelforschung.* – 1995. – Vol. 45, № 7. – P. 771–776.
28. D'Hahan, N. A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers / N. D'Hahan, H. Jacquet, C. Moreau, P. Catty, M. Vivaudou // *Mol. Pharmacol.* – 1999a. – Vol. 56, № 2. – P. 308–315.
29. Giudicelli, J.F. Potassium channel activators: from pharmacology to therapeutics / J.F. Giudicelli, C. Richer // *Therapie.* – 1989. – Vol. 44. – № 6. – P. 419–430.
30. Gribble, F.M. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell KATP channels / F.M. Gribble, S.J. Tucker, S. Seino, F.M. Ashcroft // *Diabetes.* – 1998. – Vol. 47, № 9. – P. 1412–1418.
31. Gross, G.J. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs / G.J. Gross, J.A. Auchampach // *Circ Res.* – 1992. – Vol. 70. – P. 223–233.
32. Inducible nitric oxide synthase in the myocardium / I. Buchwalow [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2001. Jan. – Vol. 217, N 1/2. – P. 73–82.
33. Keri, R.S. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole - Based Medicinal Chemistry / R.S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi, B.M. Nagaraja // *Chem Biol Drug Des.* – 2015. – Vol. 86, № 1. – P. 19–65. doi: 10.1111/cbdd.12462.
34. Miyoshi, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K₁ channel of vascular smooth muscle cells / H. Miyoshi, Y. Nakaya, H. Moritoki // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 345. – P. 47–49.
35. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir 6.1 / Takashi Miki [et al.] // *Nature medicine.* – 2002. – Vol. 8, N 7. – P. 446–472.

36. N-Phenyl indole derivatives as AT1 antagonists with anti-hypertension activities: Design, synthesis and biological evaluation / Zhu W [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2016. – Vol. 115. – P. 161-78. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.021
37. Opening of Ca-activated K- channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice / X. Wang [et al.] // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 2070–2077.
38. Pandit, L. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS / L. Pandit K.E. Kolodziejska, S. Zeng, N.T. Eissa // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, № 4. – P. 1211-1215.
39. Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells / W. S. Park [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2008. – Vol. 457, №. 1. – P. 137–147.
40. Punzalan, C. Redox regulation of the rat hepatocyte iNOS promoter. / C. Punzalan, C. Cai, R.A. Schroeder, P.C. Kuo // *Surgery.* – 1999. – Vol. 126, № 2. – P. 450-445.
41. Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance / Zingman, L.V. [et al.] // *Neuron.* – 2001. – Vol. 31, № 2. – P. 233–245.
42. Stowe, D.F. Cardiac mitochondrial preconditioning by big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation / D.F. Stowe // *Am J Physiol Heart Circ physiol.* – 2006. – Vol. 290, № 1. – P. H434-H440.
43. Synthesis and biological evaluation of 2-methyl-1H-benzimidazole-5-carbohydrazides derivatives as modifiers of redox homeostasis of *Trypanosoma cruzi* / S. Melchor-Doncel de la Torre [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2017. – Vol. 27, № 15. – P. 3403-3407. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.06.013.
44. Vasomotor control in mice overexpressing human endothelial nitric oxide synthase / van Deel E.D. [et al.] // *Am J Physiol Heart CircPhysiol.* – 2007. - Vol. 293. – P. H1144–H1153.
45. Wai-Kei. Chan Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta / Wai-Kei Chan, Xiaoqiang Yao, Wing-Hung Ko, Yu Huang // *Cardiovascular Research.* – 2000. – Vol. 46. – P.180-187.
46. Waldman, S.A. Cyclic GMP synthesis and function / S.A.Waldman, F. Murad // *Pharmacol. Rev.* – 1987. – Vol. 39. – P. 163-196.
47. Waldman, S.A. Desensitization to nitroglycerin in vascular smooth muscle from rat and human / S.A.Waldman, R.M. Rapoport, R.Ginsburg, F.Murad // *Biochem. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 35. – P. 3525-3531.
48. Waldman, S.A., Cyclic GMP synthesis and function / S.A.Waldman, F. Murad // *Pharmacol. Rev.* – 1987. - Vol. 39. – P. 163-196.
49. Wang, T. Inducible nitric oxide synthase aggresome formation is mediated by nitric oxide / T. Wang, Y. Xia // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 426. – P. 386-389.
50. Zamotaeva, M.N. Efficiency of structurally different antioxidants in combined myocardial damage in mice / M.N. Zamotaeva, V.I. Inchina, I.N. Chairkin // *Bull Exp Biol Med.* – 2012. – Vol. 152, № 3. – P. 318-320.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты многолетних исследований нашей лаборатории доказывают роль стресса в патогенезе сердечно-сосудистой патологии, в основе которого лежит дисфункция эндотелия. Было показано, что основными механизмами стресс-индуцированных изменений тонуса сосудов и сократительной способности сердца являются активация свободнорадикального окисления, гиперпродукция монооксида азота, нарушение редокс-состояния клеток. Нами и другими исследователями продемонстрировано, что при различных моделях стресса, экспериментального сахарного диабета образуется NO, продуцируемый iNOS.

Традиционно считается, что iNOS синтезируется при патологических состояниях. В этом случае NO продуцируется в количествах, тысячекратно превышающих его нормальную продукцию. На сегодняшний день, описаны экспериментальные данные где «конститутивные» изоформы NO-синтаз (eNOS, nNOS) экспрессируются индуцибельно; и наоборот, iNOS выражен конститутивно.

Роль монооксида азота, продуцируемого iNOS, в кардиопротекции до настоящего времени остается противоречивой. С одной стороны, показано, что при тяжелой периодической гипоксии, характерной для апноэ во сне, наблюдается высокая активность и экспрессия iNOS, что сопровождается выраженным ростом уровня NO в миокарде, и повышением риска развития гипертензии, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда [Parish J.M., et al 2004]. С другой стороны, описаны кардио- и вазопротективные эффекты NO, наблюдаемые при активации iNOS. В частности, умеренная периодическая гипоксия сопровождается антиаритмическим эффектом [Asemu G., et al., 2000; Meerson F.Z., 1994], снижает артериальное давление при гипертензии [Serebrovskaya T.V., et al., 2008; Лямина Н.П., и др. 2001; Serebrovskaya T.V., Manukhina E.B., Smith M.L. et al., 2008], используется при реабилитации пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование [Аммянц В.Ю., 1996].

Впервые предпринята попытка провести сравнительный анализ изменения функции коронарных и некоронарных сосудов, сократительной активности миокарда, связанных с образованием NO при адаптации к коротким стрессорным воздействиям (физиологическое состояние), с таковыми при иммобилизационном стрессе и экспериментальном сахарном диабете (патологические состояния).

При стрессе и экспериментальном сахарном диабете наблюдается снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. Снижается адренореактивность изолированного кольца аорты и увеличивается эндотелий-зависимая вазодилатация, по сравнению с контрольными показателями. Использование селективного ингибитора iNOS S-метилизотиомочевина указывает на то, что при стрессе, экспериментальном сахарном диабете индуцибельная NO-синтаза играет определяющую роль в нарушении тонуса коронарных и некоронарных сосудов, а также сократительной способности миокарда.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям не оказывала влияния на тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда. Однако, при исследовании адренореактивности изолированного сегмента аорты, отмечалась тенденция к ее снижению и незначительному увеличению эндотелий-зависимой вазорелаксации. Использование S-метилизотиомочевина возвращало адренореактивность до контрольных значений, но существенно угнетало эндотелий-зависимую вазодилатацию. Таким образом, нами впервые показано, что при адаптации к стрессу образуется iNOS. Индуцибельная NO-синтаза чрезвычайно важна для сохранения нормальных взаимоотношений в регуляторных механизмах тонуса артериальных сосудов, особенно в эндотелий-зависимой вазодилатации.

На основе сравнительного анализа экспрессии различных изоформ NOS продемонстрировано, что при тяжелом продолжительном стрессе, экспериментальном сахарном диабете и адаптации к стрессу увеличена экспрессия гена, ответственного за

синтез iNOS в равной степени. Однако активность этого фермента, между группами была различной. Так тяжелый стресс и экспериментальный сахарный диабет сопровождались снижением активности эндотелиальной NO-синтазы и увеличением индуцибельной. Несмотря на увеличение активности фермента iNOS в группе адаптированных животных, активность эндотелиальной NO-синтазы не отличалась от контрольных показателей. Выраженная локализация белка iNOS и слабая eNOS определялась в эндотелии коронарных и артериальных сосудов стрессовых животных и крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Напротив, в группе, адаптированных к стрессу животных, локализация белка iNOS была умеренной, а eNOS выраженной, определялась в эндотелии коронарных и некоронарных сосудов.

В группах животных, перенесших стресс и экспериментальный сахарный диабет, определялось увеличение концентрации продуктов деградации монооксида азота и продуктов перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантной активности, в гомогенате левого желудочка. Описанные процессы происходили в условиях воспаления низкой интенсивности, которое определялось увеличением концентрации С-реактивного белка и интерлейкина 1β в плазме крови.

На фоне увеличения концентрации NO^2-/NO^{3-} в гомогенате левого желудочка животных, адаптированных к коротким стрессорным воздействиям, отмечалось увеличение антиоксидантной активности. Показатели продуктов перекисного окисления липидов, С-реактивного белка и интерлейкина 1β не отличались от контроля.

Становится очевидным, что влияние активации iNOS на функциональное состояние тонуса сосудов и миокарда во многом зависит от количества NO, длительности его образования, а также от локализации и условий, в которых он будет синтезирован.

Еще одним из направлений в исследовании стала сформулированная новая концепция о роли K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов в iNOS-зависимые механизмы ограничения постстрессорных нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, что может быть рассмотрено как один из механизмов кардио- и вазопротекции.

Нами установлено, что тяжелый стресс и экспериментальный сахарный диабет приводит к нарушению функциональной активности калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках сосудов. В основе повреждения их активности лежит как активация свободнорадикального окисления, так и гиперпродукция оксида азота, синтезируемого iNOS. Адаптация к стрессу сопровождалась скрытой активацией как ATP -чувствительных, так и $ВК$ -каналов, расположенных в гладкомышечных клетках коронарных сосудов. На основании полученных нами данных можно констатировать, что при адаптации к стрессу NO, продуцируемый iNOS, модулирует функциональную активность K_{ATP} - и $ВК$ -каналов и находится с ними в реципрокной зависимости. В серии экспериментов на животных с системно блокированной системой синтеза iNOS было продемонстрировано, что: во-первых, системная блокада iNOS приводит к срыву адаптационных механизмов; во-вторых в этих условиях увеличивается функциональная активность K_{ATP} - и $ВК$ -каналов гладкомышечных клеток сосудов. Этот факт наводит на мысль о том, что NO, образуемый iNOS при адаптации к стрессу, ограничивает активность K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов в физиологических условиях, и по принципу отрицательной обратной связи усиливает одну из систем локальной регуляции тонуса сосудов при угнетении другой. Этот факт можно рассматривать как биологическую целесообразность, заключающуюся в ступенчатой защите сердца от коронарospазма при последующем стрессе.

Поиск веществ, которые бы обладали кардио- и вазопротективным эффектом остается до сих пор актуальным. Мы протестировали гипотезу о том, что предварительное использование производного бензимидазола – 2-этил-тиобензимидазола гидробромид и активатора K_{ATP} -каналов пинацидил, приводят к дозированному образованию iNOS; в свою очередь, NO, продуцируемый iNOS, модулирует функциональную активность $ВК_{Ca}$ -

и K_{ATP} -каналов и предупреждает постстрессорные нарушения тонуса коронарных сосудов у крыс.

Результаты, полученные в данной работе, могут быть предложены для формирования предложений по разработке новых лекарственных препаратов со структурой подобной активаторам K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов, с целью дозируемого образования iNOS. Такие препараты будут обладать защитным эффектом, реализующимся через NO-зависимые механизмы.

Знание этапов и молекулярных механизмов регуляции iNOS позволит контролировать активность этого фермента, что представляет несомненный интерес для практической медицины и имеет важное значение в выработке целенаправленной терапевтической стратегии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Научное издание
Лазуко Светлана Степановна

Механизмы регуляции тонуса сосудов сердца: роль iNOS и калиевых каналов

Монография

Редактор С.С. Лазуко
Технический редактор И.А. Борисов
Компьютерная верстка С.С. Лазуко
Корректор С.С. Лазуко

Подписано в печать _____. Формат бумаги 64×84 1/16
Бумага типографская №2. Гарнитура _____.
Усл.-печ. л. _____. Усл.-изд. л. _____.
Тираж _____. Заказ № _____.

Издатель и полиграфическое исполнение
УО «Витебский государственный медицинский университет»
ЛП № 02330/453 от 30.12.2013 г.
Пр. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск